Euroopan unionin
virallinen lehti

L 112

60. vuosikerta

Suomenkielinen laitos

Lainsäädäntö

28. huhtikuuta 2017

Sisältö

II *Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset*

ASETUKSET

★ **Komission asetus (EU) 2017/735, annettu 14 päivänä helmikuuta 2017, 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 liitteen muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen** [1] 1

[1] ETA:n kannalta merkityksellinen teksti.

FI

Säädökset, joiden otsikot on painettu laihalla kirjasintyypillä, ovat maatalouspolitiikan alaan kuuluvia juoksevien asioiden hoitoon liittyviä säädöksiä, joiden voimassaoloaika on yleensä rajoitettu.

Kaikkien muiden säädösten otsikot on painettu lihavalla kirjasintyypillä ja merkitty tähdellä.

II

(Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EU) 2017/735,

annettu 14 päivänä helmikuuta 2017,

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 liitteen 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 2 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 kemikaalien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) On tarpeen ajantasaistaa asetus (EY) N:o 440/2008, jotta siihen voidaan sisällyttää uusia ja ajantasaistettuja testimenetelmiä, jotka Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö (OECD) on vastikään hyväksynyt, tekniikan kehityksen huomioon ottamiseksi ja sen varmistamiseksi, että koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää vähennetään Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2010/63/EU ([3]) mukaisesti. Sidosryhmiä on kuultu tästä säädösluonnoksesta.

(3) Tämä mukauttaminen tekniikan kehitykseen sisältää 20 testimenetelmää: yksi menetelmä, joka koskee fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien määrittämistä, viisi uutta ja yksi ajantasaistettu testimenetelmä, jotka koskevat ekotoksisuuden arviointia, kaksi ajantasaistettua testimenetelmää, jotka koskevat ympäristössä kulkeutumisen ja käyttäytymisen arviointia, sekä neljä uutta ja seitsemän ajantasaistettua testimenetelmää, jotka koskevat ihmisten terveydelle aiheutuvien vaikutusten määrittämistä.

(4) OECD tarkistaa testiohjeitaan säännöllisesti yksilöidäkseen ne testiohjeet, jotka eivät enää ole tieteellisesti päteviä. Tässä mukautuksessa tekniikan kehitykseen poistetaan kuusi testimenetelmää, joita vastaavat OECD:n testiohjeet on peruutettu.

([1]) EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
([2]) Komission asetus (EY) N:o 440/2008, annettu 30 päivänä toukokuuta 2008, testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 (REACH) nojalla (EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1).
([3]) 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).

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

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

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

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

2 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kahdentenakymmenentenä 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 14 päivänä helmikuuta 2017.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

Jean-Claude JUNCKER

LIITE

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

1) Lisätään A osaan luku seuraavasti:

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

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 112 (1981)

Edellytykset

— Sopiva analyysimenetelmä

— Vesiliukoisuus

Ohjeet

— Rakennekaava

— Sähkönjohtavuus konduktometrisessä menetelmässä

Testimenetelmää koskevat lausumat

— Kaikki testimenetelmät voidaan suorittaa puhtaille tai kauppalaatuisille aineille. Epäpuhtauksien mahdolliset vaikutukset tuloksiin on otettava rahuomioon.

— Titrausmenetelmä ei sovellu huonosti liukeneville aineille (ks. testiliuokset jäljempänä).

— Spektrofotometrinen menetelmä soveltuu ainoastaan aineille, joilla on selvästi erilaiset UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektrit dissosioituneessa ja dissosioimattomassa muodossa Tämä menetelmä voi soveltua myös huonosti liukeneville aineille ja ei-happamille/emäksisille dissosiaatioille, esim. kompleksointi.

— Tapauksissa, joissa Onsagerin yhtälö pätee, konduktometristä menettelyä voidaan soveltaa jopa kohtalaisen pienten pitoisuuksien osalta ja jopa tapauksissa, joissa vallitsee ei-hapan/emästasapaino.

Vakioasiakirjat

Tämä testimenetelmä perustuu menetelmiin, jotka annetaan osassa "Lähdekirjallisuus" mainituissa lähteissä ja asiakirjassa *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* EPA, 18. elokuuta 1978.

MENETELMÄ – JOHDANTO, TARKOITUS, SOVELTAMISALA, SOVELTAMINEN JA TESTIN KÄYTTÖ JA RAJAT

Aineen dissosiaatiolla vedessä on sen ympäristövaikutuksen arvioinnin kannalta merkitystä. Se ohjaa aineen muotoa, joka puolestaan määrittää sen toiminnan ja kulkeutumisen. Se voi vaikuttaa kemikaalin adsorptioon maaperään ja sedimentteihin sekä absorptioon biologisiin soluihin.

Määritelmät ja yksiköt

Dissosiaatio on reversiibeli jakautuminen kahteen tai useampaan kemialliseen aineeseen, jotka voivat olla ionisia. Tämä prosessi esitetään yleisesti seuraavasti

$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$

ja reaktiota koskeva tasapainopitoisuuden vakio on

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Esimerkiksi erityistapauksessa, jossa R on vety (aine on happo), vakio on

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

tai

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Vertailuaineet

Seuraavia vertailuaineita ei tarvitse käyttää kaikissa tapauksissa uutta ainetta tutkittaessa. Ne mainitaan ensisijaisesti siksi, jotta menetelmän kalibrointi voidaan suorittaa ajoittain ja jotta tarjotaan mahdollisuus vertailla tuloksia toista menetelmää sovellettaessa.

	pK ([1])	Lämpötila °C
p-nitrofenoli	7,15	25 ([1])
Bentsoehappo	4,12	20
p-kloorianiliini	3,93	20

([1]) Mitään arvoa ei ole käytettävissä 20 celsiusasteelle, mutta voidaan olettaa, että mittaustulosten vaihtelu on korkeampi kuin oletettava lämpötilariippuvuus.

On hyödyllistä käyttää ainetta, jolla on useita pK-arvoja, kuten esitetään jäljempänä kappaleessa 'Testimenetelmän periaate'. Tällainen aine voi olla

Sitruunahappo	pK_a (8)	Lämpötila °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testimenetelmän periaate

Kuvattu kemiallinen prosessi on ainoastaan jonkin verran lämpötilariippuvainen ympäristön kannalta merkityksellisellä lämpötila-alueella. Dissosiaatiovakion määrittäminen edellyttää kemiallisen aineen liukenevien ja liukenemattomien muotojen pitoisuuksien mittaamista. Edellä kappaleessa 'Määritelmät ja yksiköt' ilmoitetun dissosiaatioreaktion stoikiometrian tietämyksen perusteella voidaan määrittää asiaankuuluva vakio. Tässä testimenetelmässä kuvatussa erityistapauksessa aine käyttäytyy hapon tai emäksen tavoin, ja määritys tehdään helpoiten määrittämällä aineen ionisoitujen ja ei-ionisoitujen muotojen suhteelliset pitoisuudet ja liuoksen pH-arvo. Näiden termien välinen suhde annetaan edellä kappaleessa 'Määritelmät ja yksiköt' esitetyssä pK_a -yhtälössä. Joillain aineilla on enemmän kuin yksi dissosiaatiovakio, ja vastaavia yhtälöitä voidaan laatia. Jotkut tässä kuvatuista menetelmistä ovat myös sopivia ei-happamille/emäksisille dissosiaatioille.

Laatuperusteet

Toistettavuus

Dissosiaatiovakio on toistettava (vähintään kolme määritystä) ± 0,1 log-yksikön puitteisiin.

TESTIMENETELMIEN KUVAUS

Arvon pK_a määrittämiseen voidaan käyttää kahta lähestymistapaa. Ensimmäisessä tunnettua määrää ainetta titrataan tarvittaessa hapolla tai emäksellä; toisessa määritetään ionisoitujen ja ionisoitumattomien muotojen suhteellinen pitoisuus ja sen pH-riippuvuus.

Valmisteet

Näihin periaatteisiin perustuvat menetelmät voidaan luokitella titraus-, spektrofotometrisiksi ja konduktometrisiksi menetelmiksi.

Testiliuokset

Kemiallista ainetta tulee liuottaa tislattuun veteen titrausmenetelmässä ja konduktometrisessä menetelmässä. Spektrofotometrisessä ja muissa menetelmissä käytetään puskuriliuoksia. Testiaineen pitoisuus ei saisi olla yli 0,01 M tai yli puolet kyllästymispitoisuudesta, ja liuoksen valmistamisessa on käytettävä aineen puhtainta saatavilla olevaa muotoa. Jos aine on ainoastaan huonosti liukenevaa, sitä voidaan liuottaa pieneen määrään veteen sekoittuvaa liuotinta ennen kuin edellä mainittuja pitoisuuksia lisätään.

Tyndallin sirontaa käytetään tarkistamaan emulsioiden esiintyminen liuoksissa, erityisesti jos liukoisuuden parantamiseksi on käytetty tukiliuotinta. Jos käytetään puskuriliuoksia, puskurin pitoisuus ei saisi ylittää arvoa 0,05 M.

Testiolosuhteet

Lämpötila

Lämpötila on säädettävä ainakin ± 1 °C:n tarkkuudella. Määritys tulisi mieluiten suorittaa lämpötilassa 20 °C.

Jos epäillään merkittävää lämpötilariippuvuutta, määritys on tehtävä ainakin kahdessa muussa lämpötilassa. Lämpötilavälien on oltava tässä tapauksessa 10 °C ja lämpötilan säädön ± 0,1 °C.

Analyysit

Menetelmä määräytyy testattavan aineen luonteen mukaan. Sen on oltava tarpeeksi herkkä, jotta eri lajit voidaan määrittää kussakin testiliuoksen pitoisuudessa.

Testin suorittaminen

Titrausmenetelmä

Testiliuos määritetään titraamalla emäs- tai happoliuoksella ja pH-arvo mitataan jokaisen titrantin lisäyksen jälkeen. Ennen ekvivalenttipistettä on tehtävä ainakin 10 täydentävää lisäystä. Jos ekvivalenssi saavutetaan tarpeeksi nopeasti, voidaan käyttää piirturilla varustettua potentiometriä. Tässä menettelyssä aineen kokonaismäärä ja sen pitoisuus on oltava tarkasti tiedossa. On ryhdyttävä varotoimiin hiilidioksidin poissulkemiseksi. Yksityiskohtia menettelystä, varotoimista ja laskennasta annetaan vakiotesteissä, esim. viitteet (1), (2), (3) ja (4).

Spektrofotometrinen menetelmä

Löydetään aallonpituus, jossa aineen ionisoiduilla ja ionisoitumattomilla muodoilla on huomattavasti erilaiset ekstinktiokertoimet. UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri saadaan liuoksista, joissa on vakiopitoisuus, pH-olosuhteissa, joissa aine on olennaisesti ionisoitumaton ja täysin ionisoitu ja useissa pH-arvojen väliarvoissa. Tämä voidaan tehdä joko lisäämällä väkevää happoa (emästä) suhteellisen suureen määrään testiaineliuosta monikomponenttisessa puskuriliuoksessa aluksi korkealla (matalalla) pH-arvolla (viite 5), tai lisäämällä yhtä suuret tilavuudet aineen kantaliuosta esim. veteen, metanoliin, erilaisten puskuriliuosten, jotka kattavat halutun pH-välin, vakiotilavuuteen. Valitun aallonpituuden pH- ja absorbanssiarvoista lasketaan riittävä määrä arvoja pK_a:lle käyttäen tietoja ainakin viidestä pH-arvosta, joissa aine on vähintään 10- ja korkeintaan 90-prosenttisesti ionisoitu. Lisätietoja kokeellisista yksityiskohdista ja laskentamenetelmästä annetaan viitteessä 1.

Konduktometrinen menetelmä

Käyttämällä pienen tunnetun kennovakion mittakennoa mitataan aineen noin 0,1 M liuoksen johtokykyä vedessä. Myös tämän liuoksen useiden tarkasti valmistettujen laimennuksien johtavuutta mitataan. Konsentraatiota puolitetaan kullakin kerralla ja sarjan tulisi kattaa ainakin konsentraatioiden suuruusjärjestys. Rajoittava johtuvuus äärettömässä laimennuksessa löydetään suorittamalla samanlainen koe Na-suolan kanssa ja ekstrapoloimalla. Dissosiaatioaste voidaan sen jälkeen laskea kunkin liuoksen johtavuudesta käyttämällä Onsagerin yhtälöä, ja näin ollen, Ostwaldin laimennuslakia soveltaen, dissosiaatiovakio voidaan laskea $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, jossa C on konsentraatio mooleina litraa kohti ja α dissosioitunut osa. On ryhdyttävä varotoimiin hiilidioksidin poissulkemiseksi. Lisätietoja kokeellisista yksityiskohdista ja laskentamenetelmästä annetaan vakioasiakirjoissa ja viitteessä (1), (6) ja (7).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Titrausmenetelmä

Kymmenelle mitatulle pisteelle titrauskäyrällä lasketaan pK_a-arvo. Tällaisten pK_a-arvojen keskiarvo ja keskihajonta lasketaan. Luonnos pH-arvoista vakioemäksen tai -hapon tilavuuden osalta samoin kuin taulukkomuotoinen esitys pitäisi sisällyttää tähän.

Spektrofotometriset menetelmät

Absorbanssi ja pH esitetään taulukkoina jokaisesta spektristä. Ainakin viisi pK_a -arvoa lasketaan spektrin datapisteistä, ja lisäksi lasketaan näiden tulosten keskiarvo ja standardipoikkeama.

Konduktometrinen menetelmä

Ekvivalenttijohtokyky Λ lasketaan kullekin hapon konsentraatiolle ja kullekin sellaisen seoksen konsentraatiolle, jossa on vastaava määrä happoa, plus 0,98 vastaava määrä karbonaatitonta natriumhydroksidia. Hapon määrä on korkeampi, jotta estetään hydrolyysista johtuva liika OH–. 1/Λ esitetään Ö_C ja suolan Λ_o voidaan löytää ekstrapoloimalla nollaväkevyyteen.

Hapon Λ_o voidaan laskea käyttämällä H^+:n ja Na^+:n kirjallisuusarvoja, ja pKa-arvo voidaan laskea $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ ja $Ka = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ kullekin konsentraatiolle. Paremmat arvot Ka:lle voidaan saada tekemällä korjauksia liikkuvuuden ja aktiivisuuden osalta. On laskettava pK_a-arvojen keskiarvot ja keskihajonta.

Testiraportti

Kaikki raakadata ja pK_a-arvot on toimitettava yhdessä laskentamenetelmän (mieluiten taulukkomuodossa, kuten ehdotetaan viitteessä 1, samoin kuin edellä mainittujen tilastollisten parametrien kanssa. Titrausmenetelmien osalta on esitettävä yksityiskohdat titranttien standardoinnista.

Spektrofotometrisen menetelmän osalta on esitettävä kaikki spektrit. Konduktometrisen menetelmän osalta on esitettävä yksityiskohdat kennovakion määrityksestä. Tiedot käytetystä tekniikasta, analyyttisistä menetelmistä ja kaikkien puskuriaineiden erityispiirteistä on annettava.

Testilämpötilat on ilmoitettava.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, a. 1186–1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water,* 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (ks. edellä 4 kohta).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980)."

2) Korvataan B osassa oleva B.5 luku seuraavasti:

"B.5 **AKUUTTI SILMÄN ÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 405 (2012). OECD:n testiohjeita kemikaalien testaamiseksi on tarkistettava säännöllisesti, jotta ne heijastavat parhaita käytettävissä olevia tieteellisiä menetelmiä. Tämän testimenetelmän aikaisemmissa päivityksissä kiinnitettiin erityistä huomiota mahdollisiin parannuksiin arvioimalla kaikkia testikemikaalista aiemmin saatuja tietoja, jotta vältettäisiin tarpeettomat eläinkokeet ja siten vastattaisiin eläinten hyvinvointia koskeviin näkökohtiin. Testiohjeeseen 405 (joka hyväksyttiin vuonna 1981 ja jota päivitettiin vuosina 1987, 2002 ja 2012) sisältyy suositus, jonka mukaan ennen tässä kuvatun, aineen ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä tutkivan *in vivo* -testin toteuttamista on arvioitava aiempien relevanttien tutkimustulosten painoarvo (1). Jos saatavissa olevat tiedot ovat puutteellisia, niitä voidaan täydentää vaiheittaisen menettelyn avulla (2) (3). Suositeltavaan testausstrategiaan, joka on selostettu tämän menetelmän täydennysosassa, sisältyy validoitujen ja hyväksyttyjen *in vitro* -testien suorittaminen. Kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) mukaisesti integroitu testimenettely sisältyy myös asiaankuuluviin Euroopan kemikaaliviraston ohjeisiin (21). Eläinkokeita tulisi tehdä ainoastaan, jos niitä pidetään välttämättöminä sen jälkeen, kun on tarkasteltu käytettävissä olevia vaihtoehtoisia menetelmiä ja kun niiden käyttöä pidetään asianmukaisena. Tämän päivitetyn testimenetelmän valmistelun aikana on tullut esiin tapauksia, jolloin tämän testimenetelmän soveltamista pidetään edelleen tarpeellisena tai sitä edellytetään joidenkin sääntelyjärjestelmien perusteella.

Viimeisimmässä päivityksessä keskityttiin pääasiassa kipulääkkeiden ja anestesia-aineiden käyttöön muuttamatta testiohjeen perusajatusta ja rakennetta. ICCVAM ([2]) ja riippumaton kansainvälinen tieteellinen vertaisarviointiryhmä arvioivat pintapuudutteiden rutiinikäytön käyttökelpoisuutta, systeemisiä kipulääkkeitä ja inhimillisiä päätepisteitä silmänärsytyksen *in vivo* -testauksen aikana (12). Arvioinnissa päädyttiin siihen, että pintapuudutteiden ja systeemisten kipulääkkeiden käytöllä voitaisiin välttää kokonaan tai suurin osa kivusta ja kärsimyksestä testin tulokseen vaikuttamatta, ja suositeltiin, että näitä aineita käytettäisiin aina. Tämä arviointi otetaan huomioon tässä testimenetelmässä. Pintapuudutteita ja systeemisiä kipulääkkeitä on käytettävä ja inhimillisiä päätepisteitä sovellettava akuuttia silmän ärsytystä ja syövyttävyyttä tutkivassa *in vivo*-testauksessa. Poikkeukset niiden käyttöön on perusteltava. Tässä menetelmässä kuvatuilla tarkennuksilla vähennetään merkittävästi tai vältetään eläinten kipu ja kärsimys useimmissa testaustilanteissa, joissa *in vivo*-silmätestaus on edelleen tarpeen.

Tasapainoiseen ennaltaehkäisevään kivunhoitoon tulisi sisältyä (i) rutiininomainen esikäsittely pintapuudutteella (esim. proparakaiini ja tetrakaiini) ja systeemisellä kipulääkkeellä (kuten buprenorfiini); (ii) rutiininomainen jälkikäsittely systeemisellä kivunlievityksellä (kuten buprenorfiini ja meloksikaami); (iii) eläinten kivun ja/tai kärsimyksen kliinisten merkkien suunniteltu havainnointi, seuranta ja rekisteröinti; ja (iv) kaikkien silmävammojen luonteen, vakavuuden ja etenemisen suunniteltu havainnointi, seuranta ja rekisteröinti. Tarkempia tietoja annetaan jäljempänä kuvatuissa päivitetyissä menettelyissä. Testikemikaalin annostelun jälkeen mitään muita pintapuudutteita tai kipulääkkeitä ei tulisi käyttää, jotta tutkimukseen ei vaikuteta. Kipulääkkeitä, joilla on anti-inflammatorinen vaikutus (esim. meloksikaami), ei pitäisi käyttää paikallisesti, ja systeemisesti käytettyjen annoksien ei pitäisi häiritä silmävaikutuksia.

Määritelmät annetaan tämän testimenetelmän lisäyksessä.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta, EUVL L 304, 22.11.2007, s. 1.

([2]) Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea), Yhdysvallat.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in vivo* -testiä ei pidä suorittaa ennen kuin kaikkien saatavissa olevien kemikaalin mahdolliseen silmä-ärsyttävyyteen/syövyttävyyteen liittyvien tietojen painoarvo on arvioitu. Tällaisia tietoja ovat todisteet aiemmista ihmisille ja/tai koe-eläimille tehdyistä tutkimuksista, todisteet yhden tai usean rakenteellisesti samankaltaisen aineen tai ainetta sisältävän seoksen silmä-ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä, kemikaalin voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä osoittavat tulokset (4) (5) sekä validoidut ja hyväksytyt *in vitro*- tai *ex vivo* -ihoärsyttävyys-/-syövyttävyystestit (6) (13) (14) (15) (16) (17). Tutkimukset voivat olla painoarvoanalyysia aiemmin tehtyjä tai sen tuloksena syntyneitä.

Joidenkin kemikaalien kohdalla painoarvoanalyysi voi osoittaa, että *in vivo* -testi on tarpeen kemikaalin mahdollisen silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden selvittämiseksi. Kaikissa näissä tapauksissa, ennen kuin tarkastellaan *in vivo* -silmätestin käyttöä, olisi mieluiten tehtävä tutkimus *in vitro* ja/tai *in vivo* -testeissä siitä, mitä ihon syöpymisen vaikutuksia kemikaali aiheuttaa, ja tätä olisi arvioitava testimenetelmän B.4 vaiheittaisen testimenettelyn (7) tai kemikaaliviraston toimintaohjeissa kuvatun integroidun testimenettelyn (21) mukaisesti.

Vaiheittainen testimenetelmä, johon sisältyvät validoidut silmän ärsyttävyyden/syövyttävyyden *in vivo* tai *ex vivo* -testit, sisällytetään liitteenä tähän testimenetelmään ja REACH-asetuksen nojalla Euroopan kemikaaliviraston ohjeisiin (21). Tällaisen testimenetelmän käyttöä suositellaan ennen *in vivo* -testin suorittamista. Uusia kemikaaleja testattaessa on suositeltavaa soveltaa vaiheittaista testimenettelyä, jonka avulla voidaan saada tieteellisesti päteviä tuloksia kemikaalin ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä. Sellaisten kemikaalien tapauksessa, joiden iho- ja silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä ei ole riittävästi tietoja, menettelytapaa voidaan käyttää puuttuvien tietojen hankkimiseen. Päätös käyttää jotain muuta menettelytapaa tai olla käyttämättä vaiheittaista menettelytapaa on perusteltava.

IN VIVO -TESTIN PERIAATE

Systeemisellä kipulääkkeellä ja asianmukaisella pintapuudutteella annettavan esikäsittelyn jälkeen testiaine annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen toiseen silmään. Käsittelemätön silmä toimii kontrollina. Silmän ärtymisen/syöpymisen aste arvioidaan pisteyttämällä sidekalvon, sarveiskalvon ja värikalvon vammat tietyin väliajoin. Muut silmään kohdistuvat vaikutukset ja koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset kuvataan myös, jotta vaikutuksia voidaan arvioida kokonaisuudessaan. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta stressistä ja/tai tuskista missä tahansa testin vaiheessa tai vammoja, jotka ovat yhdenmukaisia tässä testimenetelmässä kuvattujen inhimillisten päätepisteiden kanssa (ks. 26 kohta), on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon kemikaalin arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteereihin sovelletaan OECD:n ohjeasiakirjaa (8).

IN VIVO -TESTIN VALMISTELU

Lajin valinta

Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

Eläinten valmistelu

Kunkin alustavasti testiin valitun koe-eläimen molemmat silmät tutkitaan testin alkua edeltävän 24 tunnin aikana. Eläimiä, joilla esiintyy silmien ärtyneisyyttä, silmävikoja tai aiempia sarveiskalvon vaurioita, ei voi käyttää testissä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa ja 12 tuntia pimeää). Liian voimakasta valoa on vältettävä. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

TESTIMENETTELY

Pintapuudutteiden ja systeemisten kipulääkkeiden käyttö

Seuraavia menetelmiä suositellaan, jotta kipua ja kärsimystä vältetään tai se minimoidaan silmätestausta koskevissa menettelyissä. Vaihtoehtoisia menettelyjä, joiden on todettu välttävän tai lievittävän kipua tai kärsimystä yhtä hyvin tai paremmin, voidaan käyttää niiden sijasta.

— Kuusikymmentä minuuttia ennen testikemikaalin antoa buprenorfiini 0,01 mg/kg annetaan ihonalaisena injektiona, ja sillä tarjotaan oikean hoitotason mukainen systeeminen kivunlievitys. Buprenorfiinin ja muiden vastaavien systeemisesti annosteltavien opioidianalgeettien ei tiedetä tai odoteta muuttavan silmävasteita (12)

— Viisi minuuttia ennen testikemikaalin annostelua yksi tai kaksi tippaa silmiin käytettävä paikallispuudutetta (esim. 0,5 %:n proparakaiinihydrokloridi tai 0,5 %:n tetrakaiinihydrokloridi) annostellaan kuhunkin silmään. Tutkimukselle aiheutuvien häiriöiden välttämiseksi suositellaan paikallispuudutetta, joka ei sisällä säilöntäaineita. Kontrollina toimii kunkin eläimen osalta se silmä, jota ei käsitellä testikemikaalilla, mutta joka käsitellään pintapuudutteella. Jos kemikaalin ennakoidaan aiheuttavan merkittävää kipua ja kärsimystä, sitä ei pitäisi normaalisti testata *in vivo*. Kuitenkin, mikäli epäilyjä esiintyy tai kun testaus on tarpeen, on harkittava, että paikallispuudutetta annetaan täydentäviä annoksia viiden minuutin välein ennen testikemikaalin annostelua. Käyttäjien on tiedettävä, että useat pintapuuduteannokset saattaa aiheuttaa lievää vaikeusasteen lisääntymistä ja/tai lisätä kemikaalien aiheuttamien vammojen korjaantumisaikaa

— Kahdeksan tuntia testikemikaalin annon jälkeen annostellaan buprenorfiinia 0,01 mg/kg ihonalaisena injektiona ja meloksikaamia 0,5 mg/kg ihonalaisena injektiona oikean hoitotason mukaiseksi systeemiseksi kivunlievitykseksi. Vaikka ei ole tietoa siitä, että meloksikaamilla on tulehdusta estävä vaikutus silmiin, kun sitä annetaan ihon alle kerran vuorokaudessa, meloksikaamia ei tulisi antaa ennen kuin vähintään 8 tuntia testikemikaalin annostuksen jälkeen, jotta mahdolliset häiriöt tutkimuksessa vältetään (12)

— Kun on kulunut ensimmäinen kahdeksan tuntia testikemikaalin annostuksen jälkeen, buprenorfiinia 0,01 mg/kg (ihonalaisena injektiona) tulisi antaa 12 tunnin välein yhdessä meloksikaamin 0,5 mg/kg (ihonalaisena injektiona) kanssa 24 tunnin välein kunnes silmävauriot korjaantuvat ja mitään kliinisiä merkkejä kivusta ja kärsimyksestä ei esiinny. On saatavilla pitkävaikutteisia kipulääkevalmisteita, joiden kohdalla voidaan harkita kipulääkkeiden annostustiheyden harventamista

— Välittömästi testikemikaalin annostelun jälkeen on annettava nopeaa kivunlievitystä, jos ehkäisevä kivunlievitys ja pintapuudutus eivät riitä. Jos eläin osoittaa merkkejä kivusta ja kärsimyksestä tutkimuksen aikana, on annettava välittömästi annos buprenorfiinia 0,03 mg/kg ihonalaisena injektiona ja sitä on toistettava tarvittaessa 8 tunnin välein, sen sijaan, että sitä annetaan 0,01 mg/kg 12 tunnin välein. Meloksikaami 0,5 mg/kg (ihonalainen injektio) annetaan 24 tunnin välein yhdessä nopeasti annettavan buprenorfiinin kanssa, mutta vasta vähintään 8 tunnin kuluttua testikemikaalin annostelun jälkeen.

Testikemikaalin annostelu

Eläimen alaluomea vedetään varovasti silmämunasta poispäin ja testikemikaali annostellaan eläimen toisen silmän sidekalvopussiin. Sen jälkeen luomia pidetään varovasti yhdessä sekunnin ajan, jotta aine ei valuisi ulos silmästä. Toinen silmä, jota ei käsitellä, toimii kontrollina.

Kosteutus

Koe-eläinten silmiä ei saa pestä vähintään 24 tuntiin testikemikaalin annostelun jälkeen, paitsi jos kyseessä on kiinteä aine (ks. 18 kohta) tai välitön ärsyttävä tai syövyttävä vaikutus. Silmät voidaan pestä 24 tunnin kuluttua, jos se katsotaan tarpeelliseksi.

Pesemisen vaikutuksen selvittämiseksi ei suositella kontrolliryhmää, paitsi jos sille on tieteellisiä perusteita. Jos kontrolliryhmä tarvitaan, käytetään kahta kaniinia. Pesuolosuhteet on dokumentoitava tarkasti, esimerkiksi pesuaika, pesuliuoksen koostumus ja lämpötila, pesun kesto, nesteen tilavuus ja virtausnopeus.

Annostaso

(1) *Nesteiden testaus*

Testattaessa nesteitä testiannos on 0,1 ml. Kemikaalia ei saa annostella suoraan suihkepumpusta silmään. Nestesuihke on ensin kerättävä astiaan ennen 0,1 ml:n annostelua silmään.

(2) *Kiinteiden kemikaalien testaus*

Testattaessa kiinteitä kemikaaleja, tahnoja ja hiukkasmaisia aineita annoksen tilavuuden on oltava 0,1 ml tai painon enintään 100 mg. Testikemikaali jauhetaan hienoksi pölyksi. Kiinteän aineen tilavuus mitataan, kun aine on ensin kevyesti tiivistetty esimerkiksi naputtamalla mitta-astiaa. Jos kiinteä testikemikaali ei ole poistunut koe-eläimen silmästä fysiologisten mekanismien seurauksena ensimmäiseen havainnointiaikaan mennessä eli tunnin kuluttua käsittelystä, silmä voidaan huuhdella fysiologisella suolaliuoksella tai tislatulla vedellä.

(3) *Aerosolien testaus*

On suositeltavaa kerätä kaikki pumpattavat suihkeet ja aerosolit ennen niiden annostelua silmään. Ainoa poikkeus ovat paineistetuissa aerosolisäiliöissä olevat kemikaalit, joita ei voida kerätä höyrystymisen takia. Sellaisessa tapauksessa silmää pidellään auki ja testikemikaali annostellaan silmään yhtenä sekunnin kestävänä purskauksena 10 cm:n etäisyydeltä suoraan silmän edestä. Välimatka voi vaihdella suihkesäiliön paineen ja sisällön mukaan. On varottava, ettei suihkesäiliön paine vahingoita silmää. Joissakin tapauksissa voi olla syytä arvioida suihkeen voimakkuuden silmälle mahdollisesti aiheuttamat ”mekaaniset” vauriot.

Aerosoliannoksen suuruus voidaan arvioida simuloimalla testiä seuraavalla tavalla. Testikemikaali suihkutetaan punnituspaperille suoraan paperin edessä olevasta kaniinin silmän kokoisesta aukosta. Paperin painon lisäyksen avulla arvioidaan silmään suihkutettu määrä. Haihtuvien kemikaalien tapauksessa annoksen suuruus voidaan arvioida punnitsemalla keräysastia testikemikaalin poistamista ennen ja sen jälkeen.

Alkutesti (*in vivo* -silmä-ärsyttävyys/syövyttävyystesti yhdelle eläimelle)

On erittäin suositeltavaa suorittaa aluksi yhdelle eläimelle *in vivo* -testi (ks. tämän testimenetelmän täydennysosa: silmä-ärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen testaus). Havainnoilla on voitava määrittää vakavuus ja korjautuvuus ennen kuin tehdään varmistustesti toisella eläimellä.

Jos testitulos osoittaa, että kemikaali on silmää syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä kuvattua menettelyä käytettäessä, silmän ärtymistä ei pidä enää testata.

Vahvistustesti (*in vivo* -silmä-ärsyttävyystesti useille eläimille)

Jos alkutestissä ei havaita syöpymisoireita tai vakavia ärsytysoireita, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä. Jos alkutestissä todetaan voimakas ärsyttävä vaikutus, on suositeltavampaa tehdä vahvistustesti vaiheittaisen menettelyn mukaan yhdelle eläimelle kerrallaan kuin altistaa kaksi eläintä samalla kertaa. Jos toisella eläimellä esiintyy syöpymisoireita tai vakavia ärsytysoireita, testiä ei jatketa. Jos toisesta eläimestä saadaan tarpeeksi tuloksia vaaraluokituspäätöksen tekemiseksi, muita testejä ei pitäisi enää tehdä.

Havainnointijakso

Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä, jotta havaittujen vaikutusten voimakkuus ja korjautuvuus arvioidaan täydellisesti. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa merkkejä kovista tuskista tai stressistä (8). Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava tavallisesti 21 päivän ajan testikemikaalin antamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 21 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

Kliiniset havainnot ja silmäreaktioiden pisteytys

Silmiä on arvioitava kattavasti silmävaurioiden esiintymisen tai puuttumisen osalta tunnin kuluttua testikemikaalin antamisesta ja tämän jälkeen ainakin kerran päivässä. Eläimiä on arvioitava useita kertoja päivässä ensimmäisen kolmen päivän aikana, jotta varmistetaan, että lopettamispäätökset tehdään ajoissa. Koe-eläimiä on rutiininomaisesti arvioitava koko tutkimuksen keston ajan kivun ja/tai kärsimyksen kliinisten merkkien varalta (esim. silmien toistuva raapiminen tai hankaaminen, ylenmääräinen silmien räpyttely tai vuotaminen) (9) (10) (11) vähintään kaksi kertaa päivittäin, vähintään 6 tuntia havainnointien välillä, tai tarvittaessa useammin. Tämä on tarpeen, jotta (i) eläimiä arvioidaan asianmukaisesti kivun ja kärsimyksen merkkien varalta, jotta tehdään perusteltuja päätöksiä tarpeesta lisätä kipulääkkeiden annostusta ja (ii) eläimiä arvioidaan vakiintuneiden inhimillisten päätepisteiden osalta, jotta tehdään perusteltuja päätöksiä siitä, onko tarkoituksenmukaista lopettaa eläin humaanisti ja varmistaa, että tällaiset päätökset tehdään ajoissa. Fluoreseiinivärjäystä on käytettävä rutiininomaisesti ja rakolamppu- biomikroskopiaa käytetään tarpeen vaatiessa (esimerkiksi arvioitaessa sarveiskalvon haavauman yhteydessä vamman vakavuutta) havainnointivälineenä okulaarivaurion mittaamisessa ja arvioitaessa, onko humaanin lopettamisen osalta vahvistetut päätepistettä koskevat perusteet täytetty. Digitaalivalokuvia havaituista vaurioista voidaan kerätä viitteeksi ja tarjoamaan pysyvä aineisto okulaarivaurion laajuudesta. Eläintä ei saa pitää testattavana sen jälkeen kun lopulliset tiedot on saatu. Eläimet, jotka osoittavat stressin tai vakavien tuskien merkkejä, on viipymättä lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testikemikaalin vaikutusten arvioinnissa.

Inhimillisellä tavalla on lopetettava eläimet, joilla esiintyy testiaineen annostelun jälkeen seuraavia silmävammoja (ks. taulukko 1 vaurioiden asteista): sarveiskalvon puhkeaminen tai huomattava sarveiskalvon haavauma mukaan luettuna pullistuma, verta silmän etukammiossa, asteen 4 sarveiskalvosamentuma, valorefleksin puuttuminen (värikalvon vaste 2), joka jatkuu 72 tuntia, sidekalvon haavauma, sidekalvon tai vilkkukalvon kuolio tai arpeutuminen. Näin menetellään siksi, että kyseiset vauriot ovat yleensä korjautumattomia. Lisäksi suositellaan, että seuraavia silmävammoja käytetään inhimillisinä päätepisteinä tutkimusten lopettamiseksi ennen suunniteltua 21 päivän tarkkailujaksoa. Näiden vaurioiden katsotaan osoittavan, että vamma aiheutuu vakavasti ärsyttävistä tai syövyttävistä kemikaaleista johtuvista vaurioista, joiden ei odoteta täysin poistuvan 21 päivän tarkkailujakson loppuun mennessä: vamman ulottuminen vakavaan syvyyteen (esim. sarveiskalvon haavauma, joka ulottuu strooman pintakerroksiin), sarveiskalvon rajan tuhoutuminen > 50 % (jota osoittaa sidekalvokudoksen vaalentuminen), ja vakava silmätulehdus (märkivä, rähmäinen silmä). Seuraavaa yhdistelmää voidaan pitää potentiaalisesti hyödyllisinä kriteereinä, jotka vaikuttavat kliiniseen päätökseen tutkimuksen ennenaikaisesta päättämisestä: sarveiskalvon pinnan verisuonittuminen (eli pannus); fluoreseiinivärjätty alue, jonka ala ei pienene ajan mittaan päivittäisen arvioinnin perusteella; ja re-epitelisaation puuttuminen viiden päivän kuluttua testikemikaalin antamisesta. Nämä havainnot eivät kuitenkaan riitä yksittäin perusteiksi tutkimuksen ennenaikaiselle päättämiselle. Kun vakavia silmävaikutuksia on havaittu, tarkkailijana olevaa/pätevää laboratorion eläinlääkäriä tai henkilöstöä, joka on koulutettu havaitsemaan kliiniset vammat, on kuultava kliinisessä tutkimuksessa, jossa määritetään, antaako näiden vaikutusten yhdistelmä aiheen päättää tutkimus varhaisessa vaiheessa. Silmänreaktioiden pisteytys (sidekalvo, sarveiskalvo ja värikalvo) on otettava ja kirjattava 1, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua testikemikaalin annostuksesta (taulukko 1). Eläimet, joille ei kehity silmävammoja, voidaan lopettaa aikaisintaan kolme päivää testikemikaalin annostelun jälkeen. Eläimiä, joilla esiintyy muita kuin vakavia vaurioita, on tarkkailtava, kunnes vauriot häviävät, tai 21 päivää, jolloin koe päätetään. Havainnot on tehtävä ja kirjattava vähintään 1 tunnin, 24 tunnin, 48 tunnin, 72 tunnin, 7 päivän, 14 päivän ja 21 päivän kuluttua, jotta voidaan määrittää vaurioiden tila ja niiden korjautuvuus tai korjautumattomuus. Havaintoja on tehtävä tarvittaessa tiheämmin, jotta määritetään, pitääkö koe-eläin lopettaa inhimillisistä syistä tai poistaa tutkimuksesta negatiivisten tulosten vuoksi.

Silmävaurioiden pisteytys (taulukko 1) on kirjattava kussakin tarkastelussa. Kaikki muut silmävauriot (esimerkiksi sarveiskalvoverho, värjäytyminen, etukammion muutokset) tai koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset on myös raportoitava.

Reaktioiden tutkimista helpottaa luuppilasien, lampun, biomikroskoopin tai muiden sopivien laitteiden käyttö. Kun havainnot on kirjattu 24 tunnin jälkeen, silmiä voidaan edelleen tutkia fluoreskeiinin avulla.

Silmävasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Silmävasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorion ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevän henkilöstön on oltava riittävän perehtynyttä pisteytysjärjestelmään.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten arviointi

Silmä-ärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vammojen luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta kemikaalin ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska testikemikaalin muutkin vaikutukset ovat arvioinnissa mukana. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä pitäisi tarkastella viitearvoina, jotka ovat merkitseviä vain, kun kaikki muut havainnot ja niiden arviointi tukevat pisteiden antamaa tietoa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Perustelut in vivo -testin tekemiselle: aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvon analyysi, mukaan luettuna vaiheittaisen menettelyn tulokset:

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus

— testimenettelyn kustakin vaiheesta saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, mukaan luettuna niiden suorittamistapa ja testi-/viitekemikaalista saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vivo* -ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä sekä niiden tulokset

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testikemikaali:

— tunnistetiedot (esim. kemikaalin nimi ja CAS-numero, jos se tiedetään, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, alkuperä, erän numero)

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esimerkiksi pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius, reaktiivisuus veden kanssa)

— jos kyseessä on seos, aineet on tunnistettava mukaan lukien tunnistetiedot ainesosista (esim. kemialliset nimet ja CAS-numerot, jos ne tiedetään) ja niiden pitoisuudet

— käytetty annos.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, konsentraatio (tilanteen mukaan), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet:

— käytetty laji ja kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle

— eläinten ikä testin alussa

— uros- ja naaraseläinten määrä testi- ja kontrolliryhmissä (jos tarpeen)

— eläinyksilöiden paino testin alussa ja lopussa

— eläinten alkuperä, häkkijärjestelyt, ruokavalio ja niin edelleen.

Puudutusaineet ja kipulääkkeet

— annokset ja ajat, jolloin pintapuudutteita ja systeemisiä kipulääkkeitä annettiin

— jos on käytetty paikallispuudutusainetta, sen tunnistetiedot, puhtaus, laji ja mahdollinen yhdysvaikutus testikemikaalin kanssa.

Tulokset:

— kuvaus ärsytyksen pisteytyksessä käytetystä välineestä kullakin havaintokerralla (esimerkiksi lamppu, biomikroskooppi, fluoreskeiini)

— taulukkomuotoiset tiedot kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteesta kullakin havaintokerralla siihen asti, kun eläin on poistettu testistä

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta

— kuvaus kaikista silmässä havaituista vaurioista (esimerkiksi verisuonittuminen, sarveiskalvoverhon muodostus, umpeen muurautuminen, värjäytyminen)

— kuvaus muualle kuin silmään kohdistuvista vaurioista sekä koko elimistöön kohdistuvista haittavaikutuksista, kivun ja kärsimyksen kliinisten merkkien kirjaaminen, digitaalivalokuvat ja mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta

Tulosten tulkinta

Koe-eläimille tehtyjen silmä-ärsytystestien tulosten ekstrapolointi ihmisiä koskeviksi on vain rajoitetusti pätevää. Monissa tapauksissa albiinokaniini on ihmistä herkempi silmää ärsyttäville tai syövyttäville aineille.

Tulosten tulkinnassa on huolellisesti erotettava sekundäärisestä tulehduksesta johtuva ärsytys.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410–429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

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

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In vitro*, 2, 19–26.

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

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, s. 483–524.

(7) Tässä liitteessä oleva B.4 luku, *Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.*

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

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20–36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Tässä liittessä oleva B.40 luku: *In vitro -ihosyövyttävyys: ihon sähkövastusmääritystesti (TER).*

(14) Tässä liitteessä oleva B.40 a luku: *In vitro -ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.*

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Tässä liitteessä oleva B.47 luku: Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(17) Tässä liitteessä oleva B.48 luku: Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä, jolla tunnistetaan i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3. painos, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) YK (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 4. tarkistettu painos. United Nations Publications.

(20) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. Euroopan unionin virallinen lehti L 353, s. 1-1355.

(21) ECHA:n ohjeet tietovaatimuksista ja kemikaaliturvallisuusarvioinnista, R.7a luku: Päätepisteitä koskevat erityisohjeet (Endpoint specific guidance)

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Taulukko 1

Silmävaurioiden pisteytys

Sarveiskalvo	Pisteytys
Samentuma: tiheysaste (mittausarvot otettava tiheimmästä kohdasta) (*)	
Ei haavaumia tai samentumaa	0
Yksittäisiä tai hajanaisia samentuma-alueita (muu kuin lievä normaalin kiillon himmentyminen); värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä	1
Selvästi erottuva läpinäkyvä alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan peittyneet	2
Helmiäishohtoinen alue; värikalvon yksityiskohtia ei erotu lainkaan; pupilli tuskin erottuva	3

Sarveiskalvo	Pisteytys
Samea sarveiskalvo; värikalvo ei erotu samentuman läpi	4
Suurin mahdollinen pistemäärä: 4	
Värikalvo	
Tavanomainen	0
Selvästi syventyneet poimut, verentungosta, turvotusta, keskinkertaista verekkyyttä sarveiskalvon ympärillä tai injektio; värikalvon reagoiminen valoon (viivästynyt reaktio katsotaan testiaineen vaikutukseksi	1
Verenvuoto, vakavasti tuhoutunut värikalvo tai ei reaktiota valoon	2
Suurin mahdollinen pistemäärä: 2	
Sidekalvo	
Punaisuus (viittaa luomen ja silmämunan sidekalvoon; pois lukien sarveiskalvo ja värikalvo)	
Tavanomainen	0
Joitakin hypereemisiä verisuonia (injektoitu)	1
Laajalle levinnyt helakka punaisuus; yksittäiset suonet eivät erotu selvästi	2
Laajalle levinnyt voimakas punaisuus	3
Suurin mahdollinen pistemäärä: 3	
Sidekalvopöhö	
Turvotus (viittaa luomiin ja/tai vilkkukalvoon)	
Tavanomainen	0
Hiukan normaalia enemmän turvotusta	1
Selvää turvotusta, luomet osittain kääntyneet ympäri	2
Turvotusta, luomet puoliksi muurautuneet umpeen	3
Turvotusta, luomet enemmän kuin puoliksi muurautuneet umpeen	4
Suurin mahdollinen pistemäärä: 4	

(*) Sarveiskalvosamentuman alue on mainittava.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Ei-ärsyttävä: Aineita, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai GHS:n kategoriaan 1, 2, 2A tai 2B; tai EU-kategoriaan 1 tai 2 (17) (18) (19).

Happo-/emäsreservi: Kun kyse on happamista valmisteista, tämä on määrä (grammaa) natriumhydroksidia/100 g valmistetta, jota tarvitaan tietyn pH-arvon tuottamiseen. Kun kyse on emäksisistä valmisteista, tämä on määrä (grammaa) natriumhydroksidia, joka vastaa (grammaa) rikkihappoa/100 g valmistetta, jota tarvitaan tietyn pH-arvon tuottamiseen (Young et al. 1988).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Porrastettu menettely: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Lisätestausta ei tarvita, jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Silmää syövyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPA-järjestelmän kategoriaan I silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EU:n kategoriaan 1 (17) (18) (19).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmälle kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1 silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EPAn kategoriaan I silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EU:n kategoriaan 1 (17) (18) (19).

Silmää ärsyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan II tai III silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai GHS:n kategoriaan 2, 2A tai 2B silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai EU:n kategoriaan 2 (17) (18) (19).

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö (todistusnäyttöprosessi): Tiedon kokoamisen vahvuuksia ja heikkouksia käytetään perustana päättelylle, joka ei välttämättä käy ilmi yksittäisistä tiedoista.

TESTIMENETELMÄN B.5 TÄYDENNYS [1]

SILMÄ-ÄRSYTTÄVYYDEN JA -SYÖVYTTÄVYYDEN VAIHEITTAINEN TESTAUS

Yleisiä huomautuksia

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi on tärkeää välttää tarpeettomia eläinkokeita ja tehdä mahdollisimman vähän sellaisia testejä, jotka todennäköisesti aiheuttavat elämissä vakavia vasteita. Ennen *in vivo* -testin suunnittelemista on arvioitava kaikki tiedot testikemikaalin mahdollisesta silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä. Riittävät todisteet testikemikaalin silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden luokittelemiseksi voivat jo olla olemassa, jolloin koe-eläintestejä ei tarvita. Painoarvoanalyysin ja vaiheittaisen menettelyn käyttö vähentää *in vivo* -testien tarvetta, erityisesti jos on todennäköistä, että testikemikaali aiheuttaa vakavia reaktioita.

On suositeltavaa arvioida aineiden silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä saatavissa olevien tietojen painoarvo, jotta voidaan päättää, tarvitaanko kemikaalin silmä-ärsyttävyyspotentiaalin määrittämiseksi muita testejä kuin *in vivo* -silmätesti. Jos muita testejä tarvitaan, on suositeltavaa käyttää vaiheittaista menettelyä relevanttien koetulosten hankkimiseksi. Jos ainetta ei ole testattu aikaisemmin, vaiheittaisen menettelyn avulla voidaan hankkia silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden arviointiin tarvittavat tulokset. Tässä täydennyksessä kuvattu alkuperäinen testimenetelmä kehitettiin OECD:n työryhmässä (1). Se on vahvistettu ja laajennettu myöhemmin järjestelmässä Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, sellaisena kuin se vahvistettiin kemikaalikomitean ja kemikaalityöryhmän 28. yhteisessä kokouksessa marraskuussa 1998 (2) ja kuten OECD:n asiantuntijatyöryhmä päivitti sitä vuonna 2011.

Vaikka tämä vaiheittainen testausstrategia ei ole olennainen osa testimenetelmää B.5, siinä kuvataan suositeltavaa lähestymistapaa aineen silmä-ärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien määrittämiseen. Tämä lähestymistapa edustaa sekä parhaita käytäntöjä että eettistä vertailukohdetta silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testauksessa. Siinä annetaan ohjeita *in vivo* -testin suorittamiseen ja esitetään yhteenveto tekijöistä, jotka on käsiteltävä ennen testin aloittamista. Strategia tarjoaa lähestymistavan aiemmin saatujen tulosten arviointiin testiaineen silmä-ärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien selvittämiseksi, ja sen avulla voidaan vaihe vaiheelta tuottaa merkitseviä tuloksia kemikaaleista, joista tarvitaan lisätietoja tai joita ei ole aikaisemmin tutkittu. Strategiassa suositellaan myös käyttämään ensin validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*- tai *ex vivo* -testejä ja sen jälkeen tietyissä tapauksissa testimenetelmän B.4 tutkimuksia (3) (4).

Vaiheittaisen testausstrategian kuvaus

Ennen vaiheittaiseen menettelyyn sisältyvien testien suorittamista (kaavio) on analysoitava kaikki saatavissa olevat tiedot, jotta *in vivo* -silmätestauksen tarve voidaan määrittää. Vaikka yksittäisistä parametreista (esimerkiksi äärimmäiset pH-arvot) voidaan saada merkitseviä tietoja, on syytä ottaa huomioon tulokset kokonaisuudessaan. Kaikkien kyseessä olevan kemikaalin tai sitä rakenteeltaan vastaavan kemikaalin vaikutustietojen painoarvo on arvioitava testauspäätöksen yhteydessä, ja päätökselle on esitettävä perustelut. Ensisijaisesti on painotettava sekä ihmis- että eläintesteillä kemikaalista aiemmin saatuja tuloksia ja seuraavaksi *in vitro*- tai *ex vivo* -testien tuloksia. Syövyttävien kemikaalien *in vivo* -testejä on vältettävä aina kun se on mahdollista. Testimenettelyssä on otettava huomioon seuraavat asiat:

Arviointi olemassa olevista ihmistä ja/tai eläintä koskevista tiedoista ja/tai *in vitro* -tiedoista validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä menetelmissä (Vaihe 1).

[1] Käytettäessä REACH-asetuksen mukaista silmän ärsytyksen integroitua testimenetelmää, ks. myös ECHA:n ohjeet tietovaatimuksista ja kemikaaliturvallisuusarvioinnista, R.7a luku: Päätepisteitä koskevat erityisohjeet (Endpoint specific guidance) http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Aiemmat ihmisillä saadut tulokset, esimerkiksi kliiniset tai työperäiseen altistukseen liittyvät tutkimustulokset ja tapausselostukset ja/tai eläinkokeiden tulokset silmätesteistä ja/tai *in vitro* -tiedoista validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä silmä-ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä koskevissa menetelmissä, on otettava ensiksi huomioon, koska niistä saadaan suoraan aineen silmävaikutuksiin liittyviä tietoja. Sen jälkeen on arvioitavia saatavissa olevat tiedot ihmisillä ja/tai eläimillä tehdyistä ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä ja/tai validoiduista ja kansainvälisesti hyväksyttävistä ihosyövyttävyyttä koskevista *in vitro* -tutkimuksista. Eläinten silmiin ei saa annostella kemikaaleja, joiden tiedetään olevan syövyttäviä tai voimakkaasti ärsyttäviä, eikä kemikaaleja, joilla on ihoa ärsyttävä/syövyttävä vaikutus; tällaisten kemikaalien voidaan katsoa vaikuttavan myös silmiin. *In vivo* -testejä ei tehdä kemikaaleista, joiden silmä-ärsyttävyys tai -syövyttävyys tiedetään, eikä aineista, joista on selvästi todistettu, etteivät ärsyttäviä tai syövyttäviä.

Rakenne-aktiivisuusanalyysi (SAR) (vaihe 2).

Jos saatavilla on rakenteellisesti samankaltaisten aineiden testituloksia, ne on otettava huomioon. Kun rakenteellisesti samankaltaisista aineista tai niitä sisältävistä seoksista on saatavilla riittävästi ihmisille tehtyjen testien ja eläinkokeiden tuloksia, jotka osoittavat niiden silmä-ärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaalin, voidaan olettaa, että arvioitava testikemikaali tuottaa samanlaiset vasteet. Tällaisessa tapauksessa kemikaalia ei kenties tarvitse testata. Negatiiviset tulokset rakenteellisesti samankaltaisten aineiden tai sellaisista aineista koostuvien seosten tutkimuksista eivät vaiheittaisessa menettelyssä ole riittävä todiste siitä, ettei kemikaali ole ärsyttävä tai syövyttävä. Sekä silmä- että ihoärsyttävyys ja -syövyttävyys on selvitettävä validoitujen ja hyväksyttyjen SAR-menettelytapojen avulla.

Fysikokemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus (vaihe 3).

Kemikaalilla, jolla esiintyy äärimmäisiä pH-arvoja, kuten ≤ 2,0 tai ≥ 11,5, voi olla voimakkaita paikallisvaikutuksia. Jos kemikaali määritetään silmää syövyttäväksi äärimmäisen pH-arvon perusteella, sen happo-/emäsreservi (eli puskurointikyky) voidaan myös ottaa huomioon (5) (6) (7). Jos puskurointikyky viittaa siihen, ettei kemikaali ole silmää syövyttävä (eli kemikaalit, joilla on äärimmäinen pH-arvo ja alhainen happo/emäsreservi), tämän vahvistamiseksi on tehtävä jatkotesti, jonka on ensisijaisesti oltava validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi (ks. 10 kohta).

Muiden aiempien tietojen ottaminen huomioon (vaihe 4).

Kaikki saatavissa olevat tiedot koko elimistöön ihon kautta kohdistuvasta toksisuudesta on arvioitava tässä vaiheessa. Testikemikaalin akuutti toksisuus ihon kautta saatuna on myös otettava huomioon. Jos testikemikaali on osoitettu erittäin toksiseksi ihon kautta saatuna, sitä ei kenties tarvitse testata silmille. Vaikkakaan akuutin ihotoksisuuden ja silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden välillä ei välttämättä ole suhdetta, voidaan olettaa, että jos aine on erittäin toksinen ihon kautta saatuna, se on erittäin toksinen myös silmään annosteltuna. Tällaiset tiedot voidaan ottaa huomioon myös vaiheiden 2 ja 3 välissä.

Kemikaalin ihosyövyttävyyden arviointi, jos sitä edellytetään myös sääntelytarkoituksiin (vaihe 5).

Ihosyövyttävyyttä ja voimakasta ärsytystä koskevaa mahdollisuutta on arvioitava ensin testimenetelmän B.4 (4) ja sen liitteen (8) mukaisesti, mukaan lukien validoidut ja kansainvälisesti hyväksytyt *in vitro* -testimenetelmät ihosyövyttävyyden toteamiseksi (9) (10) (11). Jos kemikaalin osoitetaan aiheuttavan ihon syöpymistä tai vakavaa ärsytystä, sitä on syytä pitää syövyttävänä ja silmä-ärsytystä aiheuttavana. Lisäkokeet eivät ole näin ollen tarpeen. Jos kemikaali ei ole ihoa syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä, on tehtävä *in vivo* tai *ex vivo* -silmätesti.

In vitro- tai *ex vivo* -testien tulokset (vaihe 6).

Kemikaaleja, joilla on todettu olevan syövyttäviä tai vakavasti ärsyttäviä ominaisuuksia validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä, nimenomaan silmä- ja ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden mittaamista varten kehitetyissä *in vitro*- tai *ex vivo* -testeissä (12) (13), ei tarvitse testata eläimillä. Voidaan olettaa, että tällaiset kemikaalit aiheuttavat samoja vaikutuksia *in vivo* -testeissä. Jos validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*-/*ex vivo* -testejä ei ole saatavissa, vaiheet 5 ja 6 ohitetaan ja siirrytään suoraan vaiheeseen 7.

In vivo -testi kaniineilla (vaiheet 7 ja 8).

In vivo -silmätesti on aloitettava testaamalla ensin yksi eläin. Jos tämän testin tulokset osoittavat, että kemikaali on silmiä vakavasti ärsyttävä tai syövyttävä, jatkotestiä ei pidä tehdä. Jos alkutestissä ei todeta vakavasti ärsyttävää tai syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä. Vahvistavan testin tuloksista riippuen voidaan tarvita täydentäviä testejä. [ks. testimenetelmä B.5].

SILMÄ-ÄRSYTTÄVYYDEN/-SYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUS- JA ARVIOINTIMENETTELY

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
1	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat vaikutuksen silmiin	Vakavia silmävaurioita	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine syövyttää silmiä. Testiä ei tarvita.
		Silmiä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine ärsyttää silmiä. Testiä ei tarvita.
		Ei silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine ei ole silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä. Testiä ei tarvita.
	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat syövyttävän vaikutuksen ihoon	Ihoa syövyttävä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat voimakkaasti ärsyttävän vaikutuksen ihoon	Vakavaa ihoärsytystä aiheuttava	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Tietoja ei saatavilla tai saatavat tiedot eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
2	Suorita silmäsyövyttävyyden/-ärsyttävyyden SAR-arviointi	Ennustaa vakavia silmävaurioita	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ennustaa silmä-ärsytystä	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Harkitse ihoärsyttävyyden SAR-arviointia	Ennustaa ihosyövyttävyyttä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Ennusteita ei voida tehdä tai ennusteet ovat negatiivisia tai eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
3	Mittaa pH (puskurointikyky tarpeen mukaan)	pH ≤ 2 tai ≥ 11,5 (suuri puskurointikyky, jos relevanttia)	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	2 < pH < 11,5, tai pH ≤ 2,0 tai ≥ 11,5 ja puskurointikyky alhainen tai olematon, jos relevanttia		
	↓		

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
4	Tarkastele olemassa olevia ihon kautta saatuun systeemiseen toksisuuteen liittyviä tietoja	Erittäin toksinen silmätestauksissa käytettävinä pitoisuuksina.	Kemikaali on liian toksinen testattavaksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Mainittuja tietoja ei ole saatavilla tai kemikaali ei ole erittäin toksinen		
	↓		
5	Arvioi kokeellisesti ihosyövyttävyyden mahdollisuutta tässä liitteessä olevan B.4 luvun testimenetelmän mukaisesti, jos tätä tarvitaan sääntelytarkoituksiin	Syöpymisvaste tai vakava ärsytysvaste	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Aine ei ole syövyttävä tai vakavasti ihoa ärsyttävä		
	↓		
6	Suorita validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* tai *ex vivo* -silmätestejä.	Syöpymisvaste tai vakava ärsytysvaste	Oletetaan syövyttäväksi tai vakavasti ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein syövyttävät/vakavasti ärsyttävät kemikaalit, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ärsytysvaste	Oletetaan ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein syövyttävät/vakavasti ärsyttävät ja ärsyttävät kemikaalit, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei-ärsyttävä vaste	Oletetaan ei-ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein ei-ärsyttävät aineet ja erottaa ne oikein kemikaaleista, jotka ovat ärsyttäviä, vakavasti ärsyttäviä tai silmää syövyttäviä aineita, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Validoituja ja hyväksyttyjä in vitro- tai ex vivo -silmätestejä ei voida käyttää päätelmän tekemiseksi		
	↓		
7	Suorita *in vivo* -alkutesti yhdelle kaniinille silmävaikutuksen toteamiseksi	Vakavia silmävaurioita	Katsotaan silmiä syövyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Ei vakavia vaurioita tai ei vastetta		
	↓		

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
8	Suorita vahvistustesti vielä yhdelle tai kahdelle eläimelle	Syövyttävä tai ärsyttävä	Katsotaan silmiä syövyttäväksi tai ärsyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä	Katsotaan, että aine ei ole ärsyttävä eikä syövyttävä. Jatkotestiä ei tarvita.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pidetty Solnassa, Ruotsissa, 22.–24. tammikuuta 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

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

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

(4) Tässä liitteessä oleva B.4 luku, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

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

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

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

(8) Tässä liitteessä olevaan B.4 lukuun tehty lisäys, ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen tutkimusmenettely.

(9) Tässä liitteessä oleva B.40 luku, *In vitro* -ihosyövyttävyys: ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

(10) Tässä liitteessä oleva B.40 a luku, *In vitro* -ihosyövyttävyys: ihmisihomallitesti.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(12) Tässä liitteessä oleva B.47 luku, naudan sarveiskalvon sameutta ja läpäisevyyttä koskeva testimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.

(13) Tässä liitteessä oleva B.48 luku, eristettyä kanan silmää käyttävä testimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.”

3) Korvataan B osassa oleva B.10 luku seuraavasti:

”B.10 *In vitro*-kromosomipoikkeavuustesti nisäkässoluilla

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 473 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

In vitro -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa (2) (3) (4). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Polyploidiaa (mukaan lukien endoreduplikaatio) voi aiheutua kromosomipoikkeavuutta koskevissa määritysmenetelmissä *in vitro*. Aneugeenit voivat aiheuttaa polyploidiaa; polyploidia ei yksinään osoita aneugeenistä mahdollisuutta, se voi yksinkertaisesti osoittaa solysyklin häiriön tai sytotoksisuuden (5). Tätä testiä ei ole suunniteltu mittaamaan aneuploidiaa, vaan aneuploidian havaitsemiseen on suositeltavaa käyttää *in vitro* -mikrotumatestiä (6).

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä voidaan käyttää ihmisen tai jyrsijän pysyvien solulinjojen tai solukantojen viljelmiä. Käytettävät solut on valittava sen mukaan, mikä on solujen kasvukyky viljelmässä, karyotyypin pysyvyys, (mukaan lukien kromosomiluku) ja kromosomipoikkeavuuksien spontaanifrekvenssi (7). Tällä hetkellä käytettävissä olevien tietojen perusteella ei voida esittää vankkoja suosituksia, vaan todeta, että kemiallisten vaarojen arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon *p53*-status, geneettinen (karyotyypin) pysyvyys, DNA:n korjaantumiskapasiteetti ja testaukseen valittujen solujen alkuperä (jyrsijä tai ihminen). Tämän testimenetelmän käyttäjiä kehotetaan siten harkitsemaan näiden ja muiden solujen ominaisuuksien vaikutusta solulinjan kykyyn havaita kromosomipoikkeavuuksien induktio, kun tietoa saadaan lisää tällä alalla.

Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

In vitro -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisiin testikemikaaleihin. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On huolehdittava, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin, toisin sanoen kromosomivaurioihin, jotka eivät johdu testikemikaalien ja kromosomien suorasta vuorovaikutuksesta; tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaalisuuden muutokset (8) (9) (10), yhdysvaikutus väliaineen komponenttien kanssa (11) (12) tai liian korkeat sytotoksisuustasot (13) (14) (15) (16).

Tätä testiä käytetään havaitsemaan klastogeenisistä tapahtumista mahdollisesti johtuvat kromosomipoikkeavuudet. Kromosomipoikkeavuuden induktion analyysi on tehtävä metafaasissa olevia soluja käyttämällä. Siksi on tärkeää, että solujen pitäisi edetä mitoosiin sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä. Valmistettujen nanomateriaalien osalta tähän testimenetelmään voidaan joutua tekemään erityisiä mukautuksia, mutta niitä ei ole kuvattu tässä testimenetelmässä.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

Ihmis- tai muut nisäkäsperäiset soluviljelmät altistetaan testikemikaalille sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metabolointikyky on riittävä (ks. 13 kohta). Sen jälkeen kun soluviljelmien altistus testikemikaalille aloitetaan, ne käsitellään sopivin etukäteen määrätyin välein metafaasin pysäyttävällä kemikaalilla (esim. colcemidilla tai kolkisiinilla), solut kerätään ja värjätään, ja metafaasissa olevat solut analysoidaan mikroskooppisesti kromatidityyppisten ja kromosomityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Solut

Testissä voidaan käyttää erilaisia solulinjoja (esim. kiinanhamsterin munasarjat (CHO), kiinanhamsterin keuhkot V79, kiinanhamsterin keuhkot (CHL)/IU, TK6) tai primaarisia soluviljelmiä, myös ihmisen tai muun nisäkkään perifeerisen veren lymfosyyttejä (7). Käytettyjen solulinjojen valintaa on perusteltava tieteellisesti. Kun primaarisoluja käytetään, on käytettävä mahdollisuuksien mukaan ihmisestä peräisin olevia primaarisoluja, ja näytteet on otettava humaanien eettisten periaatteiden ja sääntöjen mukaisesti. Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on saatava nuorilta (noin 18–35-vuotiailta), terveiltä ja tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille aineille (esim. kemikaaleille tai ionisoivalle säteilylle) sellaisilla tasoilla, jotka lisäisivät kromosomaalisten poikkeavuuksien taustaesiintyvyyttä. Tällä varmistetaan, että kromosomaalisten poikkeavuuksien taustaesiintyvyys on matala ja johdonmukainen. Kromosomaalisten poikkeavuuksien esiintyminen perustasolla lisääntyy iän myötä, ja tämä suuntaus on naisilla selvempi kuin miehillä (17) (18). Jos soluja kerätään useammalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien lukumäärä on ilmoitettava. On osoitettava, että solut ovat jakaantuneet testikemikaalilla käsittelyn aloittamisen ja solujen keräämisen välillä. Soluviljelmät pidetään eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa (solulinjat) tai niitä stimuloidaan jakaantumaan (lymfosyyttien primaariset viljelmät), jotta solut altistetaan solusyklin eri vaiheissa, koska soluasteiden herkkyys testikemikaaleille ei ole ehkä tiedossa. Primaarisolut, joita on stimuloitava jakaantumaan mitogeenisilla aineilla, eivät yleensä ole enää synkronoituja testikemikaalille altistamisen aikana (esim. ihmisen lymfosyytit 48 tuntia kestävän mitogeenisen stimulaation jälkeen). Synkronoitujen solujen käyttöä käsittelyn aikana ei suositella, mutta se voidaan perustelluissa tapauksissa hyväksyä.

Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet

Soluviljelmiä on viljeltävä soveltuvassa kasvatusväliaineessa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, tarvittaessa kosteutettu ilma, jonka CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia, 37 °C:n inkubointilämpötila). Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei mykoplasmakontaminaatiota esiinny (7) (19); soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä solulinjoissa tai primaarisissa soluviljelmissä on määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen (20).

Soluviljelmien valmistelu

Solulinjat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusväliaineeseen sellaiseen tiheyteen, että suspensiossa tai yksikerrosviljelmässä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti keräämisajankohtaan asti (esimerkiksi konfluenssia on vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään (esim. 48 tunnin ajan ihmisen lymfosyyttien osalta) mitogeenin [esim. fytohemagglutiniini (PHA), kun kyse on ihmisen lymfosyyteistä] kanssa, solunjakautumisen aikaansaamiseksi ennen testikemikaalille altistamista.

Metabolinen aktivaatio

Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (21) (22) (23) tai fenobarbitaalin ja ß-naftoflavonin (24) (25) (26) (27) (28) (29) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa (30), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiväliaineessa. Mitoosi-indeksiä vähentäviä tuotteita, erityisesti kalsiumiakomplekseja aiheuttavia tuotteita (31) on vältettävä käsittelyn aikana. Testattavien kemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 23 kohta). Nestemäiset kemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (32) (33) (34). Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

Testiolosuhteet

Liuottimet

Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai viljelynesteen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Vakiintuneita liuottimia ovat esimerkiksi vesi tai dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa kasvatusväliaineessa. Jos käytetään muita kuin vakiintuneita liuottimia (esim. etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sekä testijärjestelmä sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta mitään haitallisia tai klastogeenisiä vaikutuksia.

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja käsittelypitoisuuksien valitseminen

Päätettäessä suurimmasta testikemikaalin pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 22 kohta), saostumista väliaineeseen (ks. 23 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 5 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä väliaineen pH-arvon merkittävän muutoksen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittelyväliaine väärien myönteisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että riittävässä määrässä käsiteltyjä soluja on tapahtunut mitoosi testin aikana ja että käsittelyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (ks. 18 ja 22 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solukuoleman ja solukasvun indikaattoreita. Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Jos se tehdään, se ei saa korvata sytotoksisuuden mittausta pääasiallisessa kokeessa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK) tai solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL) ovat sopivia menetelmiä sytotoksisuuden arviointiin sytogeneettisissä testeissä (13) (15) (35) (36) (55) (ks. kaavojen osalta lisäys 2). Mikäli kyse on pitkäaikaisesta käsittelystä ja näytteenottoajoista sen jälkeen kun on aloitettu käsittely, joka on pidempi kuin 1,5 normaalin solusyklin kesto (ts. yhteensä yli 3 solusykliä), PSK:ssa voidaan aliarvioida sytotoksisuus (37). Tällaisissa olosuhteissa SLSM saattaa olla parempi mittari, tai sytotoksisuuden arviointi 1,5 normaalia solusyklia vastaavan ajan jälkeen on hyödyllinen arvio PSK:ta käyttäen.

Kun kyse on lymfosyyteistä primaariviljelmissä, vaikka mitoosi-indeksi (MI) on sytotoksisten/sytostaattisten vaikutusten mitta, siihen vaikuttavat käsittelyn jälkeinen mittausaika, käytetty mitogeeni ja mahdolliset solusyklin häiriöt. MI on kuitenkin hyväksyttävä, koska muut sytotoksisuuden mitat saattavat olla hankalia ja epäkäytännöllisiä ja niitä ei mahdollisesti voida soveltaa PHA-stimulaation vaikutuksesta kasvavien lymfosyyttien kohdepopulaatioon.

Vaikka SMSL ja PSK solulinjojen tapauksessa ja MI primaarisissa lymfosyyttiviljelmissä ovat suositeltuja sytotoksisuuden parametrejä, muillakin indikaattoreilla (esim. solujen eheys, apoptoosi, nekroosi, solusykli) voidaan antaa hyödyllistä lisätietoa.

Vähintään kolmea hyväksyttävyysperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Solujen tyypistä riippumatta (solulinjat tai primaariset lymfosyyttiviljelmät) kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, vain yhden viljelmän käyttö on myös hyväksyttävää edellyttäen, että yksittäisestä viljelmästä tai rinnakkaisviljelmistä lasketaan sama kokonaismäärä soluja. Yhden viljelmän käyttö on erityisen merkityksellistä, kun arvioidaan useampaa kuin kolmea pitoisuutta (ks. 31 kohta). Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset voidaan yhdistää analyysia varten (38). Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, sopiva pitoisuuksien välinen kerroin on yleensä 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 22 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja tietojen saamiseksi vähäisestä ja keskitason sytotoksisuustasosta tai annosvastesuhteen tutkimiseksi tarkasti on käytettävä pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja/tai useampaa kuin kolmea pitoisuutta (yksittäisiä viljelmiä tai rinnakkaisviljelmiä) erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 47 kohta).

Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden on oltava 55 ± 5 % käyttäen suositeltuja sytotoksisuuden parametrejä (solulinjojen SMSL:n ja PSK:n pieneneminen ja MI:n pieneneminen lymfosyyttien primaariviljelmissä 45 ± 5 %:iin rinnakkaisesta negatiivisesta kontrollista). On tulkittava varovaisesti positiivisia tuloksia, jotka on havaittu ainoastaan tämän sytotoksisuuden 55 ± 5 %:n vaihteluvälin yläpäässä (13).

Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalilla käsittelyn päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyy pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen (esim. värjäykseen tai pisteytykseen). Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän elatusaineeseen.

Jos ei havaita saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (39) (40) (41). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksien reaktiotuote tai biologinen materiaali (UVCB) (42) taikka ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esim 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (43).

Kontrollit

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava rinnakkaiset negatiiviset kontrollit (ks. 15 kohta), jotka koostuvat pelkästään tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan osoittamaan laboratorion kyky tunnistaa klastogeenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus, kun tämä on tarpeen. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään alla olevassa taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenimutaatiotestit ovat riittävän standardoidut, positiivisten kontrollien käyttö voi rajoittua klastogeeniin, joka vaatii metabolista aktivaatiota. Jos tämä tehdään samanaikaisesti ei-aktivoidun testin kanssa samaa annostelukestoa soveltaen, tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän aktiivisuuden että testausjärjestelmän herkkyyden. Pitkäaikaisessa käsittelyssä (ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivointia. Kutakin positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna. Näin voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys (vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä), ja tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta.

Taulukko 1

Vertailukemikaalit, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseksi ja positiivisten kontrollien valintaan

Luokka	Kemikaali	CAS-nro
1. Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
	Sytosiiniarabinosidi	147-94-4
2. Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota		
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi	50-18-0

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja ilman sitä.

Näytteiden keräämisajankohdat

Negatiivisen tuloksen vahvistamiseksi tarvittavaa perusteellista arviointia varten testi on kuitenkin suoritettava kaikissa seuraavissa kolmessa testiolosuhteissa käyttäen lyhytaikaista käsittelyä metabolisen aktivointijärjestelmän kanssa ja ilman sitä sekä pitkäaikaista käsittelyä ilman metabolista aktivointia (ks. 43, 44 ja 45 kohta):

— soluja on altistettava testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (18)

— soluja on altistettava testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (18)

— soluja on altistettava jatkuvasti ilman metabolista aktivaatiojärjestelmää näytteenottoon saakka, joka tehdään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua. Tietyt kemialliset aineet (esim. nulkeosidianalogit) saatetaan havaita helpommin, kun altistus/näytteenottoaika on pitempi kuin 1,5 normaalia solusykliä (24).

Jos jokin edellä mainituista testiolosuhteista johtaa positiiviseen vasteeseen, muita altistusohjelmia ei ole välttämättä tarpeen tutkia.

Kromosomipreparaattien valmistus

Soluviljelmiä käsitellään colcemidilla tai kolkisiinilla yleensä 1–3 tunnin ajan ennen näytteiden keräämistä. Jokaisen viljelmän näytteet kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistusta varten. Kromosomipreparaattien valmistukseen kuuluu solujen hypotoninen käsittely, fiksointi ja värjäys. Yhden solun vahvuisissa kerroksissa voi esiintyä mitoosissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävän käsittelyn päättyessä. Koska mitoosissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä testikemikaalia sisältävän väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Jos mitoosissa olevien solujen määrän havaitaan lisääntyvän huomattavasti kontrolleihin verrattuna, mikä viittaa todennäköisesti mitoosin pysähtymiseen, solut on kerättävä sentrifugoimalla ja palautettava viljelmiin, jotta mitoosivaiheessa olevia soluja, joissa kromosomipoikkeavuuksia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta kromosomipoikkeavuuksista. Koska fiksaatio johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen kromosomien menettämiseen, lasketuissa soluissa tulisi olla sentromeerejä modaalista lukumäärää vastaava määrä ± 2.

Kustakin pitoisuudesta ja kontrollista on laskettava vähintään 300 hyvin levinnyttä metafaasia sen päättelemiseksi, että testikemikaali on selvästi negatiivinen (ks. 45 kohta). Nämä 300 solua jaetaan tasan rinnakkaisnäytteisiin, jos käytetään rinnakkaisviljelmiä. Jos käytetään yhtä viljelmää pitoisuutta kohti (ks. 21 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 300 hyvin levinnyttä metafaasia. Tämän 300 solun laskennan ansiosta testin tilastollista voimaa lisätään ja lisäksi nolla-arvoja havaitaan harvoin (niitä oletetaan olevan vain viisi prosenttia) (44). Laskettujen metafaasien määrää voidaan vähentää, kun havaitaan korkea määrä soluja, joissa on kromosomipoikkeavuuksia ja testikemikaalia pidetään selkeästi positiivisena.

Solut, joissa on rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia mukaan lukien ja ilman aukkoja (gaps), lasketaan. Katkeamiset (breaks) ja aukot määritellään liitteessä 1 lähteiden (45) ja (46) perusteella. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä varmistetaan, että kromosomipoikkeavuuden analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat ja niitä vertaisarvioidaan tarvittaessa.

Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidian ja endoreduplikaation esiintymistaajuudet, mikäli näitä esiintyy. (Ks. 2 kohta).

Laboratorion pätevyys

Jotta voidaan vahvistaa riittävä kokemus testin suorittamisesta ennen kuin sitä käytetään rutiinitestaukseen, laboratoriossa on teetettävä sarja kokeita positiivisilla vertailukemikaaleilla, jotka toimivat eri mekanismien kautta, ja erilaisia negatiivisia kontrolleja (käyttäen erilaisia liuottimia/kantaja-aineita). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden on oltava lähdekirjallisuuden mukaisia. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joista on 37 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

Tiettyjä positiivisia kontrollikemikaaleja (ks. 26 kohdassa oleva taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pitkillä käsittelyillä ilman metabolista aktivaatiota, ja myös lyhyellä käsittelyllä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa, jotta pätevyys havaita klastogeenisia kemikaaleja osoitetaan ja metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus määritetään. Valittujen kemikaalien eri pitoisuudet valitaan siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

Kun ensimmäisen kerran saadaan tietoja aiemman negatiivisen kontrollin jakaumasta, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien pitäisi olla julkaistujen kontrollitietojen mukaisia, jos sellaisia on olemassa. Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle (44) (47). Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeelle, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (48)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseeen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (44). Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (47).

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

Negatiivisten kontrollitietojen tulisi koostua kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudesta yhdessä viljelmässä tai rinnakkaisten viljelmien summasta, kuten 21 kohdassa kuvataan. Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle (44) (47). Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 37 kohta), sekä siitä, ettei kyse ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

On arvioitava niiden solujen prosenttiosuus, joissa on kromosomipoikkeavuuksia. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet (katkeamiset, vaihdokset) on lueteltava erikseen ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä on mainittava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen. Polyploidian ja/tai endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen prosenttiosuus raportoidaan, kun tämä havaitaan.

Lisäksi pääasiallisissa kromosomipoikkeavuustesteissä on rekisteröitävä kaikissa testiviljelmissä sekä negatiivisissa ja positiivisissa kontrolliviljelmissä tehdyt samanaikaiset sytotoksisuusmittaukset.

Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.

Hyväksyttävyysperusteet

Testi hyväksytään seuraavilla perusteilla:

— rinnakkainen negatiivinen kontrolli katsotaan hyväksyttäväksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 39 kohdan mukaisesti

— rinnakkaisten positiivisten kontrollien (ks. 26 kohta) on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— solujen proliferaatiota koskevien kriteereiden on täytyttävä liuotinkontrollissa (17 ja 18 kohta)

— testi suoritettiin kaikissa kolmessa koeolosuhteessa, ellei jokin niistä tuottanut positiivisia tuloksia (ks. 28 kohta)

— riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (31 ja 21 kohta)

— suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 22, 23 ja 24 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 28 kohta):

a) vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkittävän lisääntymisen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) lisäys riippuu annoksesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c) jokin tuloksista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; ks. 39 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan indusoida kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmille tilastomenetelmille (49) (50) (51).

Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos kaikissa tarkastelluissa koeolosuhteissa (ks. 28 kohta):

a) mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) pitoisuudesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c) kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; ks. 39 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi indusoida kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen yllä kuvatulla tavalla tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arviossa ja /tai lisätutkimuksissa. Lisäsolujen laskeminen (tarvittaessa) tai kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja koeolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

Saatujen tietojen pohjalta ei harvinaisissa tapauksissa lisätutkimustenkaan jälkeen voida saada positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi testikemikaalin vaste jää epäselväksi.

Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaaleilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia (52). Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaalit kykenevät estämään solusyklin etenemisen (53) (54) (ks. 2 kohta). Siksi polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on rekisteröitävä erikseen.

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus viljelynesteessä, johon testikemikaalia lisättiin, kun tätä tarvitaan.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kun on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen osuus lopullisessa viljelynesteessä on myös ilmoitettava.

Solut

— solujen tyyppi ja lähde

— karyotyypin ominaisuudet ja käytetyn solutyypin soveltuvuus

— mykoplasman puuttuminen solulinjojen osalta

— solulinjojen osalta tiedot solysyklistä, kaksinkertaistumisajasta tai proliferaatioindeksistä

— verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja kaikki merkitykselliset tiedot luovuttajasta, tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosyyttejä, käytetty mitogeeni

— solulinjojen osalta siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla

— solulinjojen osalta soluviljelymenetelmät

— solulinjojen osalta kromosomien modaalinen lukumäärä.

Testiolosuhteet:

— metafaasin estämiseen käytetty kemikaali, sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena viljelynesteessä (esim. µg tai mg/mL tai mM viljelynesteessä)

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusväliaineen koostumus, tarvittaessa hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— viljelynesteeseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— käsittelyn kesto

— käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta

— solutiheys kylvämisen aikana, tarvittaessa

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa viljelynesteessä, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiivisen ja negatiivisen kontrollin kemikaalit, kunkin käsittelyolosuhteen lopulliset pitoisuudet

— objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat

— määrityksien hyväksyttävyysperusteet

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen metafaasien lukumäärä

— sytotoksisuuden mittausmenetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— käsiteltyjen solujen määrä ja kutakin viljelmää varten kerättyjen solujen määrä, kun käytetään solulinjoja

— sytotoksisuuden mittaaminen, esim. PSK, SMSL, MI, muut huomautukset, jos niitä on

— solulinjojen osalta tiedot solysyklistä, kaksinkertaistumisajasta tai proliferaatioindeksistä

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta,

— kromosomipoikkeavuuksien, myös aukkojen, määrittely (gaps)

— laskettujen solujen lukumäärä, kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ilmoitetaan kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta erikseen, mukaan lukien ja ilman aukkoja

— ploidian (erikseen mainittavat polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut) muutokset, jos niitä esiintyy

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aikaisemman negatiivisen (liuotin) ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 %:n kontrollirajat jakaumille sekä tietojen määrä

— tilastoanalyysit; mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (toim.), Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture teoksessa *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (toim.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, s. 427–432.

(4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, s. 318–327.

(6) Tässä liitteessä oleva B.49 luku. *In vitro -mikrotumatesti nisäkässoluilla*.

(7) ILSI paper (luonnos), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, s. 147–204.

(9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, s. 297–305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, s. 789–886.

(11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, s. 177–183.

(12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, s. 439–452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 191–201.

(14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, s. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, s. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, s. 316–326.

(17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, s. 305–309.

(18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, s. 95–106.

(19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, s. 261–287.

(20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, s.163–167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, s. 347–363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, s. 173–215.

(23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, s. 83–90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, s. 277–290.

(25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, s. 55–65.

(26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, s. 175–177.

(27) Matsushima, T. *et al.* (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (toim.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, s. 241–261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, s. 51–59.

(30) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus. Saatavilla osoitteessa: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, s. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, teoksessa *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (toim.), Plenum, New York, s. 91–103.

(33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, s. 795–801.

(34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, s. 122–130.

(35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, s. 1–3.

(36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, s. 77–83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, s. 86–87.

(38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In vitro Cytogenetic Assays. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (toim.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (testiohjeet 473, 476 ja 487) ENV/JM/TG(2014)17. Saatavilla pyynnöstä.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, s. 32–56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, s. 36–43.

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Saatavilla osoitteessa: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (toim.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al.* (1990), Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*, teoksessa *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 62–86.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

(51) Richardson, C. *et al.* (1989), Analysis of Data from *In vitro* Cytogenetic Assays, teoksessa *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, s. 29–46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, s. 403–413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, s. 1362–1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, s. 139–149.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosin tai puhkeamisen seurauksena.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Genotoksinen: yleisnimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymiselle, geenimutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Klastogeeni: kemikaali, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solupopulaatioissa tai eukaryoottisten organismien populaatioissa.

Kromatidien aukko (chromatid gap): yhden kromatidin ei-värjätty alue (akromaattinen leesio), johon liittyy minimaalinen kromatidin siirtymä.

Kromatidien katkeaminen (chromatid break): yhden kromatidin katko, jossa on yhden kromatidin selvä siirtymä.

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Käsittelemättömät kontrollit: viljelmät, joita ei altisteta aineelle (eli niihin ei käytetä testikemikaalia eikä liuotinta) vaan ne käsitellään samanaikaisesti samalla tavalla kuin testikemikaalia saavat viljelmät.

Liuotinkontrolli: yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Maksasta eristetty S9-jae: maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi (MI): suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

p53-status: p53-proteiini osallistuu solukierron säätelyyn, apoptoosiin ja DNA:n korjaukseen. Solut, joista puuttuu toimiva p53-proteiini tai jotka eivät pysty pysäyttämään solusykliä tai hävittämään vahingoittuneita soluja apoptoosilla tai muilla p53-proteiinin toimintoihin liittyvillä mekanismeilla (esimerkiksi indusoimalla DNA:n korjautumisen, ovat teoriassa alttiimpia geenimutaatioille tai kromosomipoikkeavuuksille.

Pitoisuudet: viittaa testikemikaalin lopullisiin pitoisuuksiin viljelynesteessä.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai tiettyjen kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK): populaation kaksinkertaistumismäärän lisääntyminen kemikaalille altistetuissa viljelmissä verrattuna lisääntymiseen muissa kuin käsitellyissä viljelmissä; suhde ilmaistaan prosentteina.

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

S9-seos: S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL): solujen määrän lisääntyminen kemikaalille altistetuissa viljelmissä verrattuna lisääntymiseen muissa kuin käsitellyissä viljelmissä; suhde ilmaistaan prosentteina.

Sytotoksisuus: tämän testimenetelmän kattamissa analyyseissä solulinjoja käytettäessä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen vähentymisenä tai solumäärän suhteellisena lisääntymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 17 kohta ja lisäys 2). Tämän testimenetelmän kattamissa analyyseissä primaarisia lymfosyyttiviljelmiä käytettäessä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen mitoosi-indeksin pienentymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 18 kohta ja lisäys 2).

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Mitoosi-indeksi (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\textbf{Mitoosissa olevien solujen määrä}}{\textbf{Laskettujen solujen kokonaismäärä}} \times 100$$

Solumäärän suhteellista lisääntymistä (SMSL) tai populaation suhteellista kaksinkertaistumista (PSK) suositellaan, koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{ Solujen määrän kasvu käsitellyissä viljelmissä(loppu-alku)})}{(\text{ Solujen määrän kasvu kontrolliviljelmissä(loppu-alku)})} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Populaatioiden kaksinkertaistumisten määrä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{Populaatioiden kaksinkertaistumisten määrä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

Jossa

populaation kaksinkertaistuminen = [log (solumäärä käsittelyn jälkeen ÷ alkuperäinen solumäärä)] ÷ log 2

Esimerkiksi jos SMSL tai PSK on 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi on 47 % ja mitoosi-indeksillä (MI) mitattu 55 prosentin sytotoksisuus/sytostaasi tarkoittaa, että todellinen MI on 45 prosenttia kontrollista.

Joka tapauksessa solujen määrä ennen käsittelyä on laskettava ja sen on oltava sama käsitellyissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä.

Vaikka suhteellisia solumääriä (eli solumääriä altistetuissa viljelmissä/solumääriä kontrolliviljelmissä) on käytetty aikaisemmin sytotoksisuuden parametrina, sitä ei enää suositella, koska se voi johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin.

Negatiivisissa kontrolliviljelmissä populaation kaksinkertaistumisen on oltava yhteensopiva sen vaatimuksen kanssa, että soluista otetaan näyte ajalla, joka vastaa suunnilleen 1,5 solusykliä, ja mitoosi-indeksin pitäisi olla niin korkea, että saadaan riittävä määrä mitoosissa olevia soluja, jotta voidaan luotettavasti laskea 50 prosentin vähennys."

4) Korvataan B osassa oleva B.11 luku seuraavasti:

"B.11 **Nisäkkäiden luuytimen kromosomipoikkeavuustesti**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 475 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävä luuytimen kromosomipoikkeavuustesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat edistää vasteiden saantia. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun genotoksisuuden jatkotutkimuksena.

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävää kromosomipoikkeavuustestiä käytetään testikemikaalien aiheuttamien rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien osoittamiseen nisäkkäiden, yleensä jyrsijöiden, luuydinsoluissa (2) (3) (4) (5). Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Vaikka genotoksisten kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Kromosomivauriot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kun nämä vauriot ja niihin liittyvä tapahtumat aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ne ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja koejärjestelmissä. Polyploidiaa (mukaan lukien endoreduplikaatio) voi aiheutua kromosomipoikkeavuutta koskevissa määritysmenetelmissä *in vivo*. Polyploidian lisääntyminen ei yksinään osoita aneugeenista mahdollisuutta, vaan se voi yksinkertaisesti osoittaa solysyklin häiriön tai sytotoksisuuden. Tätä testiä ei ole suunniteltu mittaamaan aneuploidiaa. Mikrotumatesti nisäkkään punasoluissa *in vivo* (tässä liitteessä oleva B.12 luku) tai *in vitro* -mikrotumatesti nisäkässoluilla (tässä liitteessä oleva B.49 luku) ovat *in vivo*- ja *in vitro* -testejä, joita suositellaan aneuploidian havainnointiin.

Käytettyjen termien määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Tässä testissä käytetään yleensä jyrsijöitä, mutta muut lajit voivat olla joissain tapauksissa sopivia, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Luuydin on tämän testin kohdekudos, sillä sen verisuonitus on hyvin runsasta ja se sisältää solupopulaation, jonka solusykli on nopea ja joka on helppo eristää ja prosessoida. Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut muiden lajien kuin rottien ja hiirten käytöstä. Jos käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä, on suositeltavaa, että luuytimen kromosomipoikkeavuuden mittaus sisällytetään toiseen sopivaan toksisuustestiin.

Jos on saatu viitteitä siitä, etteivät testikemikaalit tai niiden metaboliitit pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja ne lopetetaan humaanisti sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiinia tai colcemidia). Tämän jälkeen luuydinsoluista tehdään kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuudet analysoidaan.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Pätevyyttä koskevat tutkimukset

Jotta voidaan vahvistaa riittävä kokemus analyysin suorittamisesta ennen kuin sitä käytetään tavanomaiseen testaukseen, laboratorion on osoitettava, että se voi tuottaa odotettavissa olevat tulokset julkaistuista tiedoista (esim. (6)) kromosomipoikkeavuuden taajuuden mittaamiseen vähintään kahdella positiivisella kontrollikemikaalilla (mukaan lukien heikot vasteet, joita indusoivat pienet määrät positiivista kontrollikemikaalia), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1 ja yhdessä yhteensopivien kantaja-aine-/liuotinkontrollien kanssa (ks. 22 kappale). Näissä kokeissa pitää käyttää annoksia, joista aiheutuu toistettavissa olevaa ja annoksesta riippuvaa lukumäärän suurenemista, ja niiden on osoitettava testausjärjestelmän herkkyys sekä dynaaminen vaihteluväli kohdekudoksessa (luuydin) ja käyttää laskentamenetelmää, jota voidaan soveltaa laboratoriossa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 10–14 kohdassa tarkoitettu aiemmin kerätty tietokanta.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa laboratorion on määriteltävä:

— aiempi positiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma, ja

— aiempi negatiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa ensin tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun aikaisempien kontrollien jakaumaan lisätään enemmän kokeellisia tietoja, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Laboratorion aikaisempia negatiivisia kontrolleja koskevan tietokannan pitäisi olla tilastollisesti vankka, jotta varmistetaan laboratorion kyky arvioida negatiivisten kontrollitietojensa jakaumaa. Lähdekirjallisuuden mukaan voidaan tarvita vähintään 10 koetta, mutta mieluiten olisi tehtävä ainakin 20 koetta vastaavissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (7)), tunnistamaan kuinka vaihtelevat niiden tiedot ovat, ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän. Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (8).

Jos laboratorio ei suorita loppuun riittävää määrää kokeita tilastollisesti vankan negatiivisen kontrollin jakauman osoittamiseksi (ks. 11 kohta) pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa (kuvataan 9 kohdassa), on hyväksyttävää, että jakauma voidaan luoda ensimmäisten rutiinitutkimuksien aikana. Tässä lähestymistavassa pitäisi noudattaa lähdekirjallisuudessa (8) esitettyjä suosituksia ja negatiivisen kontrollin tuloksia, ja näissä kokeissa saatujen negatiivisten kontrollien tulosten on oltava julkaistujen negatiivisten kontrollien tuloksien mukaisia.

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon, miten ne vaikuttavat tuloksena olevien tietojen yhdenmukaisuuteen laboratorion olemassa olevan aiempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Vain suurien epäjohdonmukaisuuksien vuoksi on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta, jos asiantuntija-arviossa määritetään, että se eroaa edellisestä jakaumasta (ks. 11 kohta). Sen uudelleenluonnin aikana täysimittaista negatiivisten kontrollien tietokantaa ei ehkä tarvita varsinaisen testin suorittamiseen, jos laboratorio voi osoittaa, että sen rinnakkaisen negatiivisen kontrollin arvot ovat yhdenmukaisia aiemman tietokannan tai vastaavien julkistettujen tietojen kanssa.

Negatiivisen kontrollin tietojen tulisi koostua kunkin eläimen rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien (lukuun ottamatta aukkoja [gap]) esiintyvyydestä. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja että on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 11 kohta), ja ettei ole kyse teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Eläinlajin valinta

Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Yleisesti käytetään rottia, ja hiirten käyttö voi olla asianmukaista. Kaikkia muita sopivia nisäkäslajeja voidaan käyttää, jos raportissa esitetään tieteellinen perustelu.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Jyrsijöiden tapauksessa koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Tilassa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta ja käsittelyryhmää edustaviin pienryhmiin (enintään viisi häkkiä kohti), jos mitään aggressiivista käytöstä ei odoteta, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin ainoastaan, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

Yleensä käytetään nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (jyrsijät ovat mieluiten 6–10 viikon ikäisiä käsittelyn alussa, joskin hieman vanhemmat eläimet hyväksytään) ja ne jaetaan satunnaistetusti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti inhimillisellä minimaalisen invasiivisella toimenpiteellä (esim. rengastamalla, merkitsemällä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnuksella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla) ja sopeuttamalla laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Liuotin/kantaja-aine

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyylisellu-loosaliuos, natriumkarboksimetyylisellu-loosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta rakenteellisia poikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantajakontrollin hyväksyttävyys.

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Kuhunkin testiin pitäisi normaalisti sisällyttää ryhmä eläimiä, joita käsitellään positiivisella kontrollikemikaalilla. Tästä voidaan poiketa, jos testilaboratorio on osoittanut olevansa pätevä tekemään testin ja se on vahvistanut aikaisemman positiivisen kontrollin vaihteluvälin. Kun rinnakkaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu ja joita säilytetään erillisestä määräajoin (esim. 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta laboratoriossa, jossa koe tehdään; esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti tämän jälkeen, jos tätä tarvitaan.

Positiivisten kontrollikemikaalien pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa spontaanitasoon verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. On hyväksyttävää, että positiivinen kontrolliaine annetaan eri reittiä kuin testikemikaali käyttäen eri käsittelyaikataulua, ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää tarvittaessa samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista

Kemikaali	CAS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0
Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
Etyylinitrosourea	759-73-9
Mitomysiini C	50-07-7
Syklofosfamidi (monohydraatti)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietyleenimelamiini	51-18-3

Negatiiviset kontrollit

Negatiivisen kontrolliryhmän eläimet on sisällytettävä jokaiseen näytteenottokertaan ja niitä tulisi käsitellä aivan samalla tavalla kuin tutkimusryhmiä, paitsi ettei niitä altisteta testikemikaalille. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään liuotinta/kantaja-ainetta, kontrolliryhmän pitää saada tätä liuotinta/kantaja-ainetta. Kuitenkin, jos aikaisemmista negatiivisen kontrollin tiedoista kullakin näytteenottokerralla testilaboratoriossa käy ilmi johdonmukaisia eläinten välisiä eroja ja rakenteellisia poikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuutta, negatiivista kontrollia varten voidaan tarvita vain yksi näytteenotto. Kun negatiiviseen kontrolliin käytetään yhtä näytteenottoa, kyse pitäisi olla tutkimuksessa käytetystä ensimmäisestä näytteenottokerrasta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Mikrotuman vaste on yleensä samanlainen uros- ja naaraspuolisilla eläimillä (9) ja on odotettavissa, että tämä pätee myös rakenteellisiin kromosomipoikkeavuuksiin; tästä syystä useimmat tutkimukset voidaan suorittaa kumpaakin sukupuolta käyttäen. Tiedot, jotka osoittavat merkittäviä eroja urosten ja naaraiden välillä (esim. systeemisen toksisuuden, aineenvaihdunnan, biologisen saatavuuden, luuytimeen liittyvän toksisuuden erot, mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) voisivat kannustaa käyttämään molempia sukupuolia. Tässä tapauksessa voi olla tarkoituksenmukaista tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esim. osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla tarkoituksenmukaista tehdä yhdistelykoe. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Ryhmäkoot varmistetaan tutkimuksen alussa, jotta tarjotaan vähintään viisi tutkimukseen soveltuvaa yhtä sukupuolta edustavaa eläintä, tai kustakin sukupuolesta (jos kumpiakin käytetään) ryhmää kohti. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä. Ohjeelliseksi maksimimääräksi eläimiä koskevien vaatimusten osalta annetaan, että luuydintutkimus tehdään kahdella näytteenottokerralla, kolmella annosryhmällä ja rinnakkaisella negatiivisella kontrolliryhmällä (kussakin ryhmässä on viisi samaa sukupuolta edustavaa eläintä), ts. tarvitaan 45 eläintä.

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska sopivia tietoja ei ole vielä käytettävissä annoksen valinnan opastukseen, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa (10). Tutkimuksessa on pyrittävä tunnistamaan suurin siedetty annos, joka määritellään korkeimmaksi annokseksi, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta suhteessa tutkimuksen kestoon (esim. se aiheuttaa ruumiinpainon laskua tai vertavuotavan kudoksen sytotoksisuutta), mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin on lopetettava inhimillisesti (11).

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin toksisuuteen viittaavia muutoksia luuytimessä.

Kemikaalit, jotka osoittavat toksikokineettisten ominaisuuksien saturaation tai aiheuttavat detoksikaatioprosesseja, jotka voivat johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen käsittelyn jälkeen, voivat muodostaa poikkeuksen annoksenmäärityskriteereihin, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivisen kontrollin ryhmä ja vähintään kolme annostelutasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2, mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin annos kerta-annostelulle pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuusvaikutuksen, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla korkein annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, jonka toksisuusvaikutus on vähäinen tai jolla ei ole toksisuusvaikutusta. Kun kohdekudoksen (luuytimen) toksisuusvaikutus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus ei-toksisilla annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esim. ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisten vaatimusten piiriin.

Raja-annostesti

Jos pitoisuusalueenmäärittelykokeet tai olemassa olevat tiedot vastaavista eläinkannoista osoittavat, että vähintään raja-annokseen (kuvattu jäljempänä) perustuva altistusohjelma ei tuota havaittavia toksisuusvaikutuksia (ei esim. luuytimeen liittyvän proliferaation vähentymistä tai muita todisteita kohdekudoksen sytotoksisuudesta), ja jos genotoksisuuden ei oleteta perustuvan *in vitro* -genotoksisuustutkimuksiin tai tietoihin rakenteellisesti samankaltaisista kemikaaleista, täydellistä tutkimusta kolmella annostasolla ei ehkä pidetä tarpeellisena, mikäli on osoitettu, että testikemikaalit saavuttavat kohdekudoksen (luuytimen). Tällaisissa tapauksissa yksi annostaso raja-annoksena saattaa riittää. Kun annostelu kestää yli 14 päivää, annos on 1 000 mg/painokiloa/päivä. Kun annostelu kestää korkeintaan 14 päivää, annos on 2 000 mg/painokiloa/päivä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi perustelluksi altistusreitiksi voidaan valita esim. ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen, oraalinen (letkuruokinnalla), altistus hengitysteitse, henkitorven tai implantaation kautta kulkeva reitti. Joka tapauksessa reitti on valittava, jotta varmistetaan kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska se ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisten perustelujen nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, vaikutuksien havaitsemiseksi on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä (ks. 33–34 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa normaalisti ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä testikemikaaleja, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testikemikaalimäärän vaihtelu on minimoitava säätämällä pitoisuutta, jotta annostelun vakiotilavuus suhteessa ruumiinpainoon taataan kaikilla annostasoilla.

Altistusohjelma

Testikemikaalit annetaan yleensä yhtenä annoksena, mutta ne voidaan myös jakaa eri annoksiin (ts. kaksi tai useampaa altistuskertaa samana päivänä korkeintaan 2–3 tunnin välein), mikä helpottaa suurten määrien antamista. Näissä olosuhteissa, tai testikemikaalia hengitysteitse annettaessa, näytteenottoaika tulee ajoittaa edellisen annostelun tai altistuksen päättymisajan perusteella.

On vain vähän tietoa toistuvan annostelun menetelmän soveltuvuudesta tähän testiin. Olosuhteissa, joissa tämä testi halutaan sisällyttää toistuvan annostelun toksisuustutkimukseen, on pyrittävä välttämään kromosomivaurioisten mitoosissa olevien solujen menettäminen, mikä voi sattua toksisia annoksia käytettäessä. Sisällyttäminen on hyväksyttävää, kun korkein annos on suurempi tai yhtä suuri kuin raja-annos (ks. 29 kohta) ja annosryhmälle annetaan raja-annos koko altistusajan. Mikrotumatestiä (testimenetelmä B.12) on pidettävä soveltuvimpana kromosomipoikkeavuuksien *in vivo* -testinä, kun tällainen halutaan sisällyttää muihin tutkimuksiin.

Luuydinnäytteet on otettava kahtena eri ajankohtana eri altistuskertojen jälkeen. Jyrsijöillä ensimmäisen näytteenottovälin keston pitäisi olla 1,5 normaaliin solusykliin kuluva aika (solusykli on normaalisti 12–18 tuntia altistuksen jälkeen). Koska testikemikaalien soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solusyklin kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, myöhempi näyte tulisi kerätä 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä näytteestä. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kaikkia annosryhmiä on altistettava ja näytteitä on kerättävä analyysiin; myöhemmillä näytteenottokerroilla tarvitsee ainoastaan antaa korkein annos. Jos tutkittavaa ainetta annetaan tieteellisen perusteen nojalla pidempään kuin yhden päivän ajan, yleensä on otettava yksi näyte korkeintaan noin 1,5 normaalin solusyklin kuluttua viimeisestä altistusajankohdasta.

Käsittelyn jälkeen ja ennen näytteenottoa eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. colcemidia tai kolkisiinia), ja näytteet kerätään sen jälkeen sopivin välein. Hiirillä väli on noin 3–5 tuntia ennen keräämistä ja rotilla 2–5 tuntia. Solut kerätään luuytimestä, saatetaan turpoamaan, fiksoidaan, värjätään ja analysoidaan kromosomipoikkeavuuksien toteamiseksi (12).

Havainnot

Koe-eläimiä koskevia yleisiä kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kliinisiä oireita tulee kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava inhimillisesti ennen tutkimusajan päättymistä (11).

Kohdekudoksen altistaminen

Verinäyte on otettava sopivana ajankohtana, jotta voidaan tutkia testikemikaalien plasmatasot luuytimen altistumisen osoittamiseksi, jos tämä on perusteltua ja jos muita altistustietoja ei ole (ks. 44 kohta).

Luuydin- ja kromosomipreparaatit

Heti inhimillisen lopettamisen jälkeen luuytimen solut otetaan eläinten reisi- tai sääriluista, pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan. Tämän jälkeen metafaasissa olevat solut levitetään objektilaseille ja värjätään vakiintuneilla menetelmillä (ks. (3) (12)).

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen tutkimusta ja jaettava satunnaisotannalla siten, että laskija ei tiedä altistusolosuhteista.

Mitoosi-indeksi on määritettävä sytotoksisuuden mittana vähintään 1 000 solusta eläintä kohti kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä (myös positiivisista kontrolleista), käsittelemättömistä tai kantaja-aineen/liuottimen negatiivisen kontrollin eläimistä.

Jokaista eläintä kohti tulisi analysoida vähintään 200 metafaasia rakenteellisista kromosomipoikkeavuuksista mukaan lukien ja ilman aukkoja (gaps) (6). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta kuitenkin osoittaa, että keskimääräisen kromosomipoikkeavuuksien taustaesiintyvyys on < 1 % testilaboratoriossa, on harkittava ylimääräisten solujen pisteytystä. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä varmistetaan, että kromosomipoikkeavuuden analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat ja niitä vertaisarvioidaan tarvittaessa. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja siten kromosomien menettämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua 2n ± 2, jossa haploidinen kromosomiluku on n kyseisen lajin osalta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Jokaisen eläimen osalta on arvioitava mitoosi-indeksi, laskettujen metafaasissa olevien solujen lukumäärä, poikkeavuuksien lukumäärä solua kohti ja niiden solujen prosentuaalinen osuus, joissa on yksi tai useampia rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia. Erityyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava, ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus koe- ja kontrolliryhmien osalta on ilmoitettava. Aukot (gaps) sekä polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on rekisteröitävä erikseen. Aukkojen esiintymistaajuus ilmoitetaan, mutta sitä ei yleensä sisällytetä rakenteellisten poikkeavuuksien kokonaistaajuuden analyysiin. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä. Eläinten toksisuustiedot ja kliiniset oireet on myös raportoitava.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

a) Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan (ks. 11–14 kohta).

b) Rinnakkaisten positiivisten kontrollien tai pisteytysvalvonnan on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 20–21 kohta).

c) Asianmukainen määrä annoksia ja soluja on analysoitu.

d) Perusteet suurimman annoksen valitsemiseksi ovat yhdenmukaisia 25–28 kohdassa kuvattujen perusteiden kanssa.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

a) ainakin yhdessä tutkimusryhmässä solujen rakenteellisten kromosomimuutoksien (paitsi aukot) taajuus on lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) lisäys riippuu annoksesta ainakin yhdellä näyttöönottokerralla, kun sitä arvioidaan asianmukaisen trenditestin kanssa

c) jokin tuloksisista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat).

Jos vain suurinta annosta tutkitaan tietyllä näytteenottokerralla, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, mikäli esiintyy tilastollisesti merkittävää kasvua rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna ja tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat). Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopiville tilastomenetelmille (13). Kun tehdään annos–vaste-analyysi, on analysoitava ainakin kolmea altistettua annosryhmää. Tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on käytettävä eläintä. Kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testikemikaali aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa koeolosuhteissa:

a) yhdessäkään tutkimusryhmässä solujen rakenteellisten kromosomimuutoksien (lukuun ottamatta aukkoja [gaps]) taajuus ei ole lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) annoksesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny millään näytteenottokerralla asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c) kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman puitteissa (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat), ja

d) luuydin on altistunut testikemikaaleille.

Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (13). Näyttöön luuytimen altistumisesta testikemikaalille voi sisältyä mitoosi-indeksin alentuminen tai testikemikaalien plasman tai veritasojen mittaus. Laskimonsisäisen annostelun tapauksessa näyttöä altistumisesta ei tarvita. Vaihtoehtoisesti luuytimen altistumisen osoittamiseen voidaan käyttää samalla altistustavalla ja samalla eläinlajilla tehdyn riippumattoman tutkimuksen tietoja. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava kemikaali aiheuta koeolosuhteissa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esim. heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava lisäys), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai loppuun saatettuihin kokeisiin liittyvissä lisätutkimuksissa. Useampien solujen analysointi tai toistokokeen suorittaminen mahdollisesti käyttämällä mukautettuja koeolosuhteita voi olla joissakin tapauksissa hyödyllistä.

Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi tutkimusta pidetään epäselvänä.

Polyploidisten ja/tai endoreduplikoituneiden solujen metafaasien esiintymistaajudet metafaasissa olevien solujen kokonaismäärässä on rekisteröitävä erikseen. Polyploidisten/endoreduplikoituneiden solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaaleilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja tai solysyklin etenemistä (ks. 3 kohta).

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kuin on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— menettely eläinten yksilölliseksi tunnistamiseksi

— lyhytkestoisissa tutkimuksissa: kunkin eläimen paino kokeen alkaessa ja päättyessä; yli viikon kestävissä tutkimuksissa: kunkin eläimen paino tutkimuksen aikana ja ravinnonkulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on sisällytettävä kokeeseen.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— altistustavan ja annostelun keston valintaperusteet

— menetelmät, joilla on vahvistettu testikemikaalin pääsy yleiseen verenkiertoon tai luuytimeen

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— objektilasien valmistusmenetelmät

— toksisuuden mittausmenetelmät

— metafaasin estämiseen käytetty kemikaali, sen pitoisuus, annos ja altistusaika ennen näytteenottoa

— menetelmät eristää ja säilöä näytteitä

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen metafaasissa olevien solujen lukumäärä eläintä kohti ja mitoosi-indeksin määrittelyyn analysoitujen solujen määrä

— tutkimuksen hyväksyvyyttä koskevat perusteet

— perusteet, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— mitoosi-indeksi jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien ja aberanttien solujen tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy, mukaan lukien polyploidian ja/tai endoreduplikoituneiden solujen esiintymistaajuudet

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— tiedot, jotka osoittavat luuytimen altistumisen

— rinnakkaisista negatiivisista ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat

— aikaisemman negatiivisen ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 prosentin kontrollirajat jakaumille sekä katettu aika ja havaintojen määrä

— perusteet positiiviselle tai negatiiviselle vasteelle.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

Viitteet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (toim.), IRL Press, Washington, DC, s. 275–306.

(3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, s. 157–165.

(4) Richold, M. *et al.* (1990), *In vivo* Cytogenetics Assays, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.

(5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, s. 305–312.

(6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, s. 19–30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87–90.

(9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293–304.

(10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313–319.

(11) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, s. 147–163.

(13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: kaikki yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Gap: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Kemikaali: aine tai seos.

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla mitoosissa olevien solujen luku solupopulaation solujen kokonaismäärällä, joka on kyseisen solupopulaation proliferaatioasteen mitta.

Numeerinen poikkeavuus: testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä (aneuploidia).

Polyploidia: numeerinen kromosomipoikkeavuus, joka liittyy muutokseen koko kromosomiston määrässä, toisin kuin numeerinen muutos osassa kromosomistoa (ks. aneuploidia).

Rakenteellinen kromosomipoikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

Sentromeeri: kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLTEN EROJEN TUNNISTAMISEKSI *IN VIVO* -KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTISSÄ

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä kokeessa vähintään 5 urosta ja 5 naarasta testataan kullakin pitoisuustasolla, mikä johtaa koemalliin, jossa käytetään vähintään 40 eläintä (20 urosta ja 20 naarasta sekä asiaankuuluvat positiiviset kontrollit).

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisimmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuustaso ovat tärkeimmät vaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Tietoihin liittyvä vaihtelu ositetaan analyysissa sukupuolten ja pitoisuuksien väliseksi sekä sukupuolten ja pitoisuuksien väliseen vuorovaikutukseen liittyväksi vaihteluksi. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla.. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiivisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on laadittu monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä.. Joissain annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka käyttävät mallintamiseen perustuvaa lähestymistapaa, kuten yleistettyjä lineaarisia malleja, voivat tarkastella analyysia erilaisella, mutta vertailukelpoisella tavalla, mutta eivät välttämättä tee päätelmiä perinteisestä ANOVA-taulukosta, jonka juuret juontuvat ennen tietokoneita kehitettyihin tilastotieteen laskennan algoritmisiin lähestymistapoihin.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc."

5) Korvataan B osassa oleva B.12 luku seuraavasti:

"B.12 **Nisäkkäiden erytrosyyttimikrotumatesti**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 474 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Nisäkkäillä *in vivo* -mikrotumatesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun genotoksisuuden jatkotutkimuksena.

Nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitoosilaitteen vaurioiden toteamiseen erytroblasteissa. Testissä arvioidaan mikrotumien muodostumista erytroblasteissa analysoimalla eläinten, yleensä jyrsijöiden, luuytimen soluja tai perifeerisiä verisoluja.

Mikrotumatestin tarkoituksena on tunnistaa sellaisia sytogeneettisiä vaurioita aiheuttavat kemikaalit, jotka johtavat hitaasti liikkuvia (lagging) kromosomifragmentteja tai kokonaisia kromosomeja sisältävien mikrotumien muodostumiseen.

Kun luuytimen erytroblasti kehittyy punasolun esiasteeksi (johon viitataan joskus polykromaattisena punasoluna tai retikulosyyttinä), päätuma irtoaa solusta, ja mahdollinen muodostunut mikrotuma saattaa jäädä muutoin tumattomaan solulimaan. Päätuman puuttuminen helpottaa mikrotumien havaitsemista näissä soluissa. Mikrotumaisten punasolujen esiasteiden suurentunut esiintymistaajuus altistetuilla eläimillä osoittaa tutkittavan aineen aiheuttaman rakenteellisen tai numeerisen kromosomipoikkeavuuden.

Vasta muodostuneet punasolut tunnistetaan ja kvantifioidaan värjäämällä, mitä seuraa joko visuaalinen pisteytys mikroskooppia käyttäen, tai automaattinen analyysi. Täysikasvuisten eläinten perifeerisessä veressä tai luuytimessä olevien punasolujen esiasteiden riittävän määrän laskentaa helpottaa automaattinen laskentajärjestelmä. Tällaiset järjestelmät ovat hyväksyttäviä vaihtoehtoja manuaaliselle arvioinnille (2). Vertailevat tutkimukset ovat osoittaneet, että tällaisilla menettelyillä, asianmukaisia kalibrointistandardeja käyttämällä, voidaan tarjota parempi toistettavuus ja herkkyys samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa manuaaliseen mikroskooppipisteytykseen verrattuna (3) (4). Automaattiset järjestelmät, joilla voidaan mitata mikrotumaisten punasolujen taajuudet ovat (mutta eivät pelkästään) virtaussytometrit (5), kuva-analyysijärjestelmät (6) (7), ja laserskannaukseen perustuvat sytometrit (8).

Kromosomifragmentit voidaan erottaa kokonaisista kromosomeista useiden perusteiden perusteella, vaikka tätä ei normaalisti tehdä osana testiä. Näitä ovat kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n (jotka ovat tyypillisiä ehjille kromosomeille) esiintymisen tai puuttumisen osoittaminen. Kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n puuttuminen osoittaa, että mikrotuma sisältää ainoastaan kromosomifragmentteja, ja sen olemassaolo osoittaa kromosomin häviämisen.

Käytettyjen termien määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Nuorten täysikasvuisten jyrsijöiden luuydin on kohdekudos geneettisille vaurioille tässä testissä, koska tässä kudoksessa muodostuvat punasolut. Punasolujen esiasteiden mikrotumien mittaus perifeerisessä veressä on hyväksyttävää muissa nisäkäslajeissa, joiden osalta on osoitettu, että ne ovat riittävän herkkiä havaitsemaan kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia tai numeerisia kromosomipoikkeavuuksia näissä soluissa (indusoimalla mikrotumia punasolujen esiasteissa), ja joiden tapauksessa annetaan tieteelliset perusteet. Mikrotumaisten epäkypsien punasolujen esiintymistaajuus on pääasiallinen päätepiste. Sellaisten kypsien punasolujen taajuus, jotka sisältävät mikrotumia perifeerisessä veressä, voidaan myös käyttää päätepisteenä lajeissa, joilla ei ole vahvaa pernassa tapahtuvaa valintaa mikrotumaisilla soluilla, ja kun eläimet altistetaan yhtäjaksoisesti käytettyjen lajien punasolujen eliniän ylittävän ajan (esim. 4 viikkoa tai enemmän hiirillä).

Jos on saatu viitteitä siitä, etteivät testikemikaalit tai niiden metaboliitit pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, tarjoaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos tarjoaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille sopivaa antotapaa käyttäen. Jos käytetään luuydintä, eläimet lopetetaan inhimillisesti sopivan ajan kuluttua altistuksesta, luuytimestä otetaan näyte, ja preparaatit valmistetaan ja värjätään (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Käytettäessä perifeeristä verta verinäytteet otetaan sopivina ajankohtina altistuksen jälkeen, tehdään valmistelut ja värjätään (12) (16) (17) (18). Kun annos annetaan akuutisti, on tärkeää valita luuytimen tai veren näytteenotto aikoina, jolloin mikrotumaisten punasolujen esiasteiden käsittelyyn liittyvä induktio voidaan havaita. Kun kyse on perifeerisen veren näytteenotosta, näiden tapahtumien välillä on myös oltava kulunut tarpeeksi aikaa, jotta ne voidaan havaita kiertävässä veressä. Mikrotumien esiintyminen analysoidaan valmisteista joko havainnoimalla mikroskooppia, kuva-analyysijärjestelmää, virtaussytomeriä käyttäen tai laskerskannaukseen perustuvaa sytometria käyttäen.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Pätevyyttä koskevat tutkimukset

Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion on osoitettava, että se voi tuottaa odotettavissa olevat tulokset julkaistuista tiedoista (17) (19) (20) (21) (22) mikrotumien taajuuden mittaamiseen vähintään kahdella positiivisella kontrollikemikaalilla (mukaan lukien heikot vasteet, joita indusoivat pienet määrät positiivista kontrollikemikaalia), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1 ja yhdessä yhteensopivien kantaja-aine-/liuotinkontrollien kanssa (ks. 26 kappale). Näissä kokeissa pitää käyttää annoksia, joista aiheutuu toistettavissa olevia ja annokseen liittyviä lisääntymisiä, ja niiden on osoitettava testausjärjestelmän herkkyys ja dynaaminen vaihteluväli kohdekudoksessa (luuydin tai perifeerinen veri) ja käyttää laskentamenetelmää, jota voidaan soveltaa laboratoriossa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 14–18 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa laboratorion on määriteltävä:

— aiempi positiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma, ja

— aiempi negatiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa ensin tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun aikaisempien kontrollien jakaumaan lisätään enemmän kokeellisia tietoja, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Laboratorion aikaisempia negatiivisia kontrolleja koskevan tietokannan pitäisi olla tilastollisesti vankka, jotta varmistetaan laboratorion kyky arvioida negatiivisten kontrollitietojensa jakaumaa. Lähdekirjallisuuden mukaan voidaan tarvita vähintään 10 koetta, mutta mieluiten olisi tehtävä ainakin 20 koetta vastaavanlaisissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (23)), kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän. Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (24).

Jos laboratorio ei suorita loppuun riittävää määrää kokeita tilastollisesti vankan negatiivisen kontrollin jakauman osoittamiseksi (ks. 15 kohta) pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa (kuvataan 13 kohdassa), on hyväksyttävää, että jakauma voidaan luoda ensimmäisten rutiinitutkimuksien aikana. Tässä lähestymistavassa pitäisi noudattaa lähdekirjallisuudessa (24) esitettyjä suosituksia ja negatiivisen kontrollin tuloksia, ja näissä kokeissa saatujen negatiivisten kontrollien tulosten on oltava julkaistujen negatiivisten kontrollien tuloksien mukaisia.

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon, miten ne vaikuttavat tuloksena olevien tietojen yhdenmukaisuuteen laboratorion olemassa olevan aiempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Vain merkittävien epäjohdonmukaisuuksien perusteella on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta, jos asiantuntija-arviossa määritetään, että se eroaa edellisestä jakaumasta (ks. 15 kohta). Sen uudelleenluonnin aikana täysimittaista negatiivisten kontrollien tietokantaa ei ehkä tarvita varsinaisen testin suorittamiseen, jos laboratorio voi osoittaa, että sen rinnakkaisen negatiivisen kontrollin arvot ovat yhdenmukaisia aiemman tietokannan tai vastaavien julkistettujen tietojen kanssa.

Negatiivisen kontrollin tietojen tulisi koostua kunkin eläimen mikrotumaisten epäkypsien punasolujen esiintyvyydestä. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja että on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 15 kohta), ja ettei ole kyse teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Eläinlajin valinta

Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Hiiriä, rottia tai muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Kun käytetään perifeeristä verta, on osoitettava, että mikrotumaisten solujen poistuminen verenkierrosta pernassa ei vaaranna aiheutettujen mikrotumien havaitsemista valitussa lajissa. Tämä on selkeästi osoitettu hiiren ja rotan perifeerisessä veressä (2). Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut muiden lajien kuin rottien ja hiirten käytöstä. Jos käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä, on suositeltavaa, että indusoitujen mikrotumien mittaus sisällytetään toiseen sopivaan toksisuustestiin.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Jyrsijöiden tapauksessa koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Tilassa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta ja käsittelyryhmää edustaviin pienryhmiin (enintään viisi häkkiä kohti), jos mitään aggressiivista käytöstä ei odoteta, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin ainoastaan, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

Yleensä käytetään nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (jyrsijät ovat mieluiten 6–10 viikon ikäisiä käsittelyn alussa, joskin hieman vanhemmat eläimet hyväksytään) ja ne jaetaan satunnaistetusti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti inhimillisellä minimaalisen invasiivisella toimenpiteellä (esim. rengastamalla, merkitsemällä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnuksella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla) ja sopeuttamalla laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

Kiinteät testikemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testikemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttö saa aiheuttaa mahdollisia kemiallisia reaktioita testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta mitään mikrotumia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantajakontrollin hyväksyttävyys.

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Kuhunkin testiin pitäisi normaalisti sisällyttää ryhmä eläimiä, joita käsitellään positiivisella kontrollikemikaalilla. Tästä voidaan poiketa, jos testilaboratorio on osoittanut olevansa pätevä tekemään testin ja se on vahvistanut aikaisemman positiivisen kontrollin vaihteluvälin. Kun rinnakkaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit tai solususpensionäytteet, pisteytysmenetelmän mukaisesti). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu ja joita säilytetään erillisestä määräajoin (esim. 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta; esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti tämän jälkeen, jos tätä tarvitaan.

Positiivisten kontrollikemikaalien pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä mikrotumien esiintymistaajuudessa spontaanitasoa enemmän. Kun käytetään manuaalista pisteytystä mikroskoopilla, positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. On hyväksyttävää, että positiivinen kontrolliaine annetaan eri reittiä kuin testikemikaali käyttäen eri käsittelyaikataulua, ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää tarvittaessa samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista:

Kemikaalit ja CAS-rekisterinumero
Etyylimetaanisulfonaatti [CAS-numero 62-50-0]
Metyylimetaanisulfonaatti [CAS-numero 66-27-3]
Etyylinitrosourea [CAS-numero 759-73-9]
Mitomysiini C [CAS-numero 50-07-7]
Syklofosfamidi (monohydraatti) [CAS-numero 50-18-0 (CAS-numero 6055-19-2)]
Trietyleenimelamiini [CAS-numero 51-18-3]
Kolkisiini [CAS-numero 64-86-8] tai vinblastiini [CAS-numero 865-21-4] – aneugeeneinä

Negatiiviset kontrollit

Negatiivisen kontrolliryhmän eläimet on sisällytettävä jokaiseen näytteenottokertaan ja niitä tulisi käsitellä aivan samalla tavalla kuin tutkimusryhmiä, paitsi ettei niitä altisteta testikemikaalille. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään liuotinta/kantaja-ainetta, kontrolliryhmän pitää saada tätä liuotinta/kantaja-ainetta. Kuitenkin, jos aikaisemmista negatiivisen kontrollin tiedoista kullakin näytteenottokerralla testilaboratoriossa käy ilmi johdonmukaisia eläinten välisiä eroja ja mikrotumia sisältävien solujen esiintymistaajuutta, negatiivista kontrollia varten voidaan tarvita vain yksi näytteenotto. Kun negatiiviseen kontrolliin käytetään yhtä näytteenottoa, kyse pitäisi olla tutkimuksessa käytetystä ensimmäisestä näytteenottokerrasta.

Jos käytetään perifeeristä verta, käsittelyä edeltävä näyte on hyväksyttävä rinnakkaisen negatiivisen kontrollin sijaan lyhyen aikavälin tutkimuksissa, mikäli saadut tulokset ovat testauslaboratorion aikaisempien kontrollien tietokannan mukaisia. Rotilla on osoitettu, että pienten määrien käsittelyä edeltävällä näytteenotolla (esim. alle 100 µl/päivä) on minimaalinen vaikutus mikrotuman taustataajuuteen (25).

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Mikrotuman vaste on yleensä samanlainen uros- ja naaraspuolisilla eläimillä ja tästä syystä useimmat tutkimukset voidaan suorittaa jompaakumpaa sukupuolta käyttäen (26). Tiedot, jotka osoittavat merkittäviä urosten ja naaraiden välisiä eroja (esim. systeemisen toksisuuden, aineenvaihdunnan, biologisen saatavuuden, luuytimeen liittyvän toksisuuden erot, mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) voisivat kannustaa käyttämään molempia sukupuolia. Tällaisessa tapauksessa voi olla tarkoituksenmukaista tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esim. osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla tarkoituksenmukaista tehdä yhdistelykoe.. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Ryhmäkoot varmistetaan tutkimuksen alussa, jotta tarjotaan vähintään viisi tutkimukseen soveltuvaa yhtä sukupuolta edustavaa eläintä, tai kustakin sukupuolesta (jos kumpiakin käytetään) ryhmää kohti. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä. Ohjeelliseksi maksimimääräksi eläimiä koskevien vaatimusten osalta annetaan, että luuydintutkimus tehdään 37 kohdassa vahvistettujen parametrien mukaan kolmella annosryhmällä ja rinnakkaisella negatiivisella ja positiivisella kontrolliryhmällä (kuhunkin ryhmään kuuluu viisi samaa sukupuolta olevaa eläintä), eli tarvitaan 25–35 eläintä.

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole vielä käytettävissä annoksen valinnan opastukseen, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (27). Tutkimuksessa on pyrittävä tunnistamaan suurin siedetty annos, joka määritellään korkeimmaksi annokseksi, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta suhteessa tutkimuksen kestoon (esim. se aiheuttaa ruumiinpainon laskua tai vertavuotavan kudoksen sytotoksisuutta, mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin on lopetettava inhimillisesti (28)).

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa toksisuutta luuytimessä (esim. punasolujen esiasteiden osuuden pieneneminen punasolujen kokonaismäärästä luuytimessä tai perifeerisessä veressä yli 50 prosenttia, mutta vähintään 20 prosenttia vertailuarvosta). Kuitenkin, kun CD71-positiivisia soluja analysoidaan ääreisverenkierrossa (esim. virtaussytometrillä), tämä erittäin varhainen punasolujen esiasteiden fraktio vastaa toksisuuteen nopeammin kuin punasolujen esiasteiden suurempi RNA-positiivinen kohortti. Tästä syystä suurempi näennäinen toksisuus voi olla ilmeinen akuutin altistumisen malleissa, joissa tutkitaan CD71-positiivista punasolun esiasteen fraktiota verrattuna niihin, joissa punasolujen esiasteisiin liittyvä tunnistus perustuu RNA-sisältöön. Tästä syystä, kun kokeissa käytetään enintään viisi altistuspäivää, toksisuutta aiheuttavien testikemikaalien korkeimmaksi annostasoksi voidaan määritellä annos, joka aiheuttaa CD71-positiivisten punasolujen esiasteiden osuuden tilastollisesti merkittävän vähenemisen punasolujen kokonaismäärässä, mutta ei vähemmän kuin viisi prosenttia kontrollin arvosta (29).

Kemikaalit, jotka osoittavat toksikokineettisten ominaisuuksien saturaation tai aiheuttavat detoksikaatioprosesseja, jotka voivat johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen annostelun jälkeen, voivat muodostaa poikkeuksen annoksenmäärityskriteereihin, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivisen kontrollin ryhmä ja vähintään kolme annostelutasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2, mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurimman annoksen vähintään 14 päivän annostelun aikana pitäisi olla 1 000 mg/painokilo/päivä tai alle 14 päivän annostelun aikana 2 000 mg/painokilo/päivä. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuusvaikutuksen, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla korkein annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, jonka toksisuusvaikutus on vähäinen tai jolla ei ole toksisuusvaikutusta. Kun kohdekudoksen (luuytimen) toksisuusvaikutus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus ei-toksisilla annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esim. ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisvaatimusten piiriin.

Raja-annostesti

Jos pitoisuusalueenmäärittelykokeet tai olemassa olevat tiedot vastaavista eläinkannoista osoittavat, että vähintään raja-annokseen (kuvattu jäljempänä) perustuva altistusohjelma ei tuota havaittavia toksisuusvaikutuksia (ei esim. luuytimeen liittyvän proliferaation vähentymistä tai muita todisteita kohdekudoksen sytotoksisuudesta), ja jos genotoksisuuden ei oleteta perustuvan *in vitro* -genotoksisuustutkimuksiin tai tietoihin rakenteellisesti samankaltaisista kemikaaleista, täydellistä tutkimusta kolmella annostasolla ei ehkä pidetä tarpeellisena, mikäli on osoitettu, että testikemikaalit saavuttavat kohdekudoksen (luuytimen). Tällaisissa tapauksissa yksi annostaso raja-annoksena saattaa riittää. Kun annostelu kestää vähintään 14 päivää, annos on 1 000 mg/painokiloa/päivä. Kun annostelu kestää alle 14 päivää, annos on 2 000 mg/painokiloa/päivä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi perustelluksi altistusreitiksi voidaan valita esim. ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen, oraalinen (letkuruokinnalla), altistus hengitysteitse, henkitorven tai implantaation kautta kulkeva reitti. Joka tapauksessa reitti on valittava, jotta varmistetaan kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska se ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisien perusteiden nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä, jotta vaikutukset voidaan havaita (ks. 37 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa normaalisti ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä testikemikaaleja, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testikemikaalimäärän vaihtelu on minimoitava säätämällä pitoisuutta, jotta annostelun vakiotilavuus suhteessa ruumiinpainoon taataan kaikilla annostasoilla.

Altistusohjelma

Mieluiten tehdään ainakin kaksi käsittelyä, jolloin annos annetaan 24 tunnin välein erityisesti, kun tämä testi sisällytetään muihin toksisuustutkimuksiin. Vaihtoehtoisesti voidaan antaa yksittäisiä annoksia, jos tämä on tieteellisesti perusteltua (esim. testikemikaalien tiedetään estävän solusyklin). Testikemikaalit voidaan antaa myös eri annoksina, eli kaksi tai useampaa altistuskertaa samana päivänä korkeintaan 2–3 tunnin välein, mikä helpottaa suurten määrien antamista. Näissä olosuhteissa, tai testikemikaalia hengitysteitse annettaessa, näytteenottoaika tulee ajoittaa edellisen annostuksen tai altistuksen päättymisajan perusteella.

Testi voidaan tehdä hiirillä tai rotilla kolmella eri tavalla:

a. Eläimet altistetaan testikemikaalille yhden kerran. Luuydinnäytteitä otetaan vähintään kaksi kertaa (yksittäisestä eläinryhmästä) siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 24 tunnin ja viimeinen viimeistään 48 tunnin kuluttua altistuksesta, ja näytteenottokertojen välillä on sopiva väli, ellei ole tiedossa, että testikemikaalilla on erityisen pitkä puoliintumisaika. Mikäli näytteitä otetaan aikaisemmin kuin 24 tunnin kuluttua, tämä on perusteltava. Perifeerisestä verestä otetaan näytteitä vähintään kaksi kertaa (samasta eläinryhmästä) siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 36 tunnin kuluttua altistuksesta ja seuraavat sopivan ajan kuluttua siitä, kuitenkin viimeistään 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kaikkia annosryhmiä on altistettava ja näytteitä on kerättävä analyysiin; myöhemmillä näytteenottokerroilla tarvitsee ainoastaan antaa korkein annos. Mikäli positiivinen vaste havaitaan yhden näytteenottokerran jälkeen, lisänäytteitä ei tarvita, ellei tarvita määrällistä annos-vastetietoa. Kuvatut näytteenottoajat johtuvat mikrotumien esiintymistä ja häviämistä koskevasta kinetiikasta näissä kahdessa kudososassa.

b. Jos päivittäisiä altistuskertoja on kaksi tai useampia (esim. kaksi altistusta 24 tunnin välein), näytteet on otettava luuytimestä kerran 18–24 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta tai perifeerisestä verestä kerran 36–48 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta. (30). Kuvatut näytteenottoajat johtuvat mikrotumien esiintymistä ja häviämistä koskevasta kinetiikasta näissä kahdessa kudososassa.

c. Jos käytetään kolmea tai useampaa päivittäistä käsittelyä (esim. kolmea tai useampaa käsittelyä noin 24 tunnin välein), luuytimen näytteet on otettava viimeistään 24 tunnin kuluessa viimeisestä käsittelystä ja perifeerinen veri on otettava viimeistään 40 tunnin kuluttua viimeisestä käsittelystä (31). Tähän käsittelymalliin sisältyy comet-testin (esim. näytteenotto 2–6 tunnin kuluttua viimeisestä käsittelystä) yhdistäminen mikrotumatestiin sekä mikrotumatestin sisällyttäminen toistuvan annostelun toksisuustutkimuksiin. Kertyneet tiedot osoittavat, että mikrotuman indusoituminen voidaan havaita laajempina aikaväleinä kolmen tai useamman annostelun jälkeen (15).

Muita annostelu- tai näytteenotto-ohjelmia voidaan käyttää tarvittaessa ja tieteellisten perustelujen nojalla ja kun helpotetaan tietojen sisällyttämistä muihin toksisuustutkimuksiin.

Havainnot

Koe-eläimiä koskevia yleisiä kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kliinisiä oireita kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava inhimillisesti ennen tutkimusajan päättymistä (28). Tietyissä olosuhteissa eläimen kehon lämpötilaa voidaan tarkkailla, koska käsittelyn aiheuttama hyper- ja hypotermia ovat tuottaneet vääriä tuloksia (32) (33) (34).

Kohdekudoksen altistaminen

Verinäyte on otettava sopivana ajankohtana, jotta voidaan tutkia testikemikaalien plasmatasot luuytimen altistumisen osoittamiseksi, jos tämä on perusteltua ja jos muita altistustietoja ei ole (ks. 48 kohta).

Luuydin-/veripreparaatit

Luuydinsolut otetaan yleensä eläinten reisiluista tai sääriluista heti koe-eläinten inhimillisen lopettamisen jälkeen. Solut poistetaan, niistä tehdään preparaatit ja ne värjätään vakiintuneilla värjäysmenetelmillä. Pieniä määriä perifeerista verta voidaan ottaa asiaankuuluvien eläinten hyvinvointia koskevien vaatimusten perusteella joko käyttämällä menetelmää, joka sallii koe-eläimen selviytymisen, kuten veri häntälaskimosta tai muusta sopivasta verisuonesta, tai sydänpunktio taikka näytteenotto suurikokoisesta suonesta lopettamisen yhteydessä. Kun kyse on luuytimestä tai perifeerisestä verestä peräisin olevista punasoluista, solut voidaan analyysimenetelmästä riippuen värjätä välittömästi supravitaaliväreillä (16) (17) (18) tai niistä tehdään ensin sivelyvalmisteet ja ne värjätään sen jälkeen mikroskooppitutkimukseen tai ne fiksoidaan ja värjätään asianmukaisesti virtaussytometrista tutkimusta varten. DNA-spesifisen väriaineen (esimerkiksi akridiinioranssin (35) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (36)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Tämä etu ei sulje pois tavanomaisten väriaineiden (esim. Giemsa mikroskooppitutkimuksessa) käyttöä. Myös muita järjestelmiä [esim. selluloosapylväitä tumallisten solujen poistamiseksi (37) (38)] voidaan käyttää, mikäli nämä menetelmät on laboratoriossa osoitettu yhteensopivaksi näytteen valmistuksen kanssa.

Jos nämä menetelmät ovat sovellettavissa, antikinetokorivasta-aineita (39), fluoresenssi- in situ -hybridisaatiota pansentromeerisillä DNA-koettimilla (40), tai suoraa in situ -merkintää, johon liittyy pansentromeerispesifisiä alukkeita yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen (41) kanssa, voidaan käyttää tunnistamaan mikrotumien (kromosomin/kromosomifragmentin) luonne, jotta voidaan määrittää, johtuuko mikrotuman indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta. Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi.

Analyysi (manuaalinen ja automaattinen)

Kaikki objektilasit tai näytteet, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen minkäänlaista tutkimusta ja jaettava satunnaisotannalla siten, että laskija ei tiedä altistusolosuhteista; tällainen koodaus ei ole tarpeen käytettäessä automaattisia pisteytysjärjestelmiä, jotka eivät ole riippuvaisia silmämääräisestä tarkastuksesta ja joihin eivät vaikuta toimijan ennakkokäsitykset. Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä (esiasteet + kypsät punasolut) määritetään jokaisen eläimen osalta erikseen laskemalla yhteensä vähintään 500 punasolua luuytimestä ja 2 000 punasolua perifeerisestä verestä (42). Mikrotumaisten punasolujen esiasteiden esiintymistaajuuden määrittämistä varten on laskettava vähintään 4 000 punasolun esiastetta eläintä kohti (43). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta osoittaa, että mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taustaesiintyvyys on <0,1 % testilaboratoriossa, on harkittava ylimääräisten solujen laskentaa. Näytteitä analysoitaessa punasolujen esiasteiden osuus testikemikaalia saaneiden eläinten punasolujen kokonaismäärästä pitäisi olla vähintään 20 prosenttia kantaja-aine-/liuotinkontrollin osuudesta, kun laskenta tehdään mikroskoopilla, ja vähintään noin 5 prosenttia kantaja-aine-/liuotinkontrollin osuudesta, kun, CD71+ -punasolujen esiasteita lasketaan sytometrisillä menetelmillä (ks. 31 kohta) (29). Esim. mikroskoopilla laskettavassa luuydinkokeessa, jos punasolujen esiasteen kontrolliosuus luuytimessä on 50 prosenttia, toksisuuden yläraja käsittää 10 prosenttia punasolujen esiasteita.

Koska rotan perna eristää ja tuhoaa mikrotumaisia punasoluja, on suositeltavaa rajoittaa mikrotumaisten punasolujen esiasteiden analyysi varhaisimpaan fraktioon. Siten pidetään yllä määritysmenetelmän korkeaa herkkyyttä rotan perifeerista verta analysoitaessa. Kun käytetään automaattisia analyysijärjestelmiä, punasolujen varhaisimmat esiasteet voidaan määrittää niiden korkean RNA-pitoisuuden tai niiden pinnalla olevan transferiinireseptoreiden (CD71+) korkean tason (31) perustella. Kuitenkin suora vertailu eri värjäysmenetelmien välillä on osoittanut, että tyydyttäviä tuloksia voidaan saada erilaisilla menetelmillä, myös perinteisellä akridiinioranssivärjäyksellä (3) (4).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Punasolujen esiasteiden laskettu määrä, mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä ja punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä on lueteltava kunkin analysoidun eläimen osalta erikseen. Kun hiiriä käsitellään jatkuvasti vähintään neljän viikon ajan, tiedot mikrotumaisten kypsien punasolujen määrästä ja osuudesta on myös annettava, jos tämä kerätään. Eläinten toksisuustiedot ja kliiniset oireet on myös raportoitava.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

a. Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan (ks. 15–18 kohta).

b. Rinnakkaisten positiivisten kontrollien tai pisteytysvalvonnan on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin (ks. 24-25) kohta.

c. Asianmukainen määrä annoksia ja soluja on analysoitu.

d. Perusteet korkeimman pitoisuuden valitsemiseksi ovat yhdenmukaisia 30–33 kohdassa kuvattujen perusteiden kanssa.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

a. ainakin yhdessä tutkimusryhmässä mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuus on lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. lisäys riippuu annoksesta ainakin yhdellä näyttöönottokerralla, kun sitä arvioidaan asiaankuuluvalla trenditestillä

c. jokin tuloksisista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat).

Jos vain suurinta annosta tutkitaan tietyllä näytteenottokerralla, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, mikäli esiintyy tilastollisesti merkittävää kasvua rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna ja tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat). Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (44) (45) (46) (47). Kun tehdään annos–vaste-analyysi, on analysoitava ainakin kolmea altistettua annosryhmää. Tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä olisi käytettävä eläintä. Mikrotumatestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testikemikaali aiheuttaa mikrotumia, jotka ovat seurausta kromosomivauriosta tai mitoosilaitteen vauriosta testatun lajin erytroblasteissa. Tapauksessa, jossa testi tehtiin sentromeerien havaitsemiseen mikrotumissa, testikemikaali, joka tuottaa sentromeeria sisältäviä mikrotumia (sentromeerinen DNA tai kinetokori, joka indusoi koko kromosomin häviämisen) on osoitus siitä, että testikemikaali on aneugeeni.

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa koeolosuhteissa:

a. yhdessäkään tutkimusryhmässä mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuus ei ole lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. annoksesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny millään näytteenottokerralla asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c. kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman puitteissa (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat)

d. luuydin on altistunut testikemikaaleille.

Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (44) (45) (46) (47). Näyttöön luuytimen altistumisesta testikemikaalille voi sisältyä punasolujen esiasteiden ja kypsien punasolujen suhteen alentuminen tai testikemikaalien plasman tai veritasojen mittaaminen. Laskimonsisäisen annostelun tapauksessa näyttöä altistumisesta ei tarvita. Vaihtoehtoisesti luuytimen altistumisen osoittamiseen voidaan käyttää samalla altistustavalla ja samalla eläinlajilla tehdyn riippumattoman tutkimuksen tietoja. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava kemikaali aiheuta koeolosuhteissa mikrotumia testattujen lajien punasolujen esiasteissa.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Tapauksissa, joissa vaste ei ole selvästi negatiivinen tai positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esim. heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava lisäys), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai loppuun saatettuihin kokeisiin liittyvissä lisätutkimuksissa. Joissakin tapauksissa useampien solujen analysointi tai toistokokeen suorittaminen mahdollisesti käyttämällä mukautettuja koeolosuhteita voi olla hyödyllistä.

Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi tutkimusta pidetään epäselvänä.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— menettely eläinten yksilölliseksi tunnistamiseksi

— lyhytkestoisissa tutkimuksissa: kunkin eläimen paino kokeen alkaessa ja päättyessä; yli viikon kestävissä tutkimuksissa: kunkin eläimen paino tutkimuksen aikana ja ravinnonkulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on sisällytettävä kokeeseen.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— altistustavan ja annostelun keston valintaperusteet

— menetelmät, joilla on vahvistettu testikemikaalin pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— objektilasien valmistusmenetelmät

— menetelmät eristää ja säilöä näytteitä

— toksisuuden mittausmenetelmät

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden laskentaperusteet

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuuden määrittelyyn ja punasolujen esiasteiden ja kypsien punasolujen suhteen määrittelyyn analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti

— tutkimuksen hyväksyvyyttä koskevat perusteet

— menetelmät, kuten antikinetokorivasta-aineiden tai sentromeerispesifisten DNA-koettimien käyttö sen määrittämiseen, sisältyykö mikrotumiin kokonaisia kromosomeja tai niiden fragmentteja, tarvittaessa.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— punasolujen esiasteiden osuus punasolujen kokonaismäärästä

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä, ilmoitetaan erikseen jokaisesta eläimestä

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden keskiarvo ± keskihajonta ryhmää kohti

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— rinnakkaisista negatiivisista ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat

— aikaisemman negatiivisen ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 prosentin kontrollirajat jakaumille sekä katettu aika ja datapisteiden määrä

— tiedot, jotka osoittavat luuytimen altistumisen

— niiden tietojen luonnehdinta, jotka osoittavat, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja tai niiden fragmentteja, tarvittaessa

— perusteet positiiviselle tai negatiiviselle vasteelle, jotka on täytetty.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

Viitteet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. et al. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, s. 10–30.

(3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, s. 92–107.

(4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, s. 83–91.

(5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, s. 139–145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, s. 65–73.

(7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, s. 149–154.

(8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, s. 153–155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, s. 187–190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, s. 9–15.

(11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, s. 61–118.

(12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, s. 29–80.

(13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, s. 555–558.

(14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, s. 103–112.

(15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, s. 513–522.

(16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 245/4, s. 245–249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, s. 83–98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, s. 153–159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, s. 239–273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, s. 45–50.

(21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, s. 419–424.

(22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, s. 84–100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87–90.

(25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 108–120.

(26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293–304.

(27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313–319.

(28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, s. 222–228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, s. 313–319.

(31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, s. 234–252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, s. 79–83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, s. 7–14.

(34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, s. 120–127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, s. 241–247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, s. 269–275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, s. 91–104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, s. 121–126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, s. 411–415.

(40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, s. 297–302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, s. 99–104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, s. 97–99.

(43) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(44) Richold, M. *et al.* (1990), *In vivo* Cytogenetics Assays, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.

(45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

(46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, s. 49–52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, s. 233–241.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Erytroblasti: varhainen vaihe punasolun kehityksessä, joka edeltää välittömästi punasolun esiastetta, jossa soluun sisältyy yhä tuma.

Kemikaali: aine tai seos.

Kinetokori: proteiinirakenne, joka muodostuu eukaryoottisolujen sentometrin päälle ja joka yhdistää kromosomin tumasukkulan mikrotubuluksen sukkularihmoihin mitoosin ja meioosin aikana ja toimii solunjakautumisen aikana ohjaten sisarkromatidit irti toisistaan.

Mikrotumat: pieniä solun päätumasta erillisiä ja niiden rinnalla esiintyviä tumia, jotka muodostuvat mitoosin (meioosin) telofaasin aikana hitaasti liikkuvista (lagging) kromosomikappaleista tai kokonaisista kromosomeista.

Normokromaattinen tai kypsä punasolu: täysin kypsä punasolu, joka on menettänyt enukleaation jälkeen jäljellä olevan RNA:n ja/tai on menettänyt muut lyhytaikaiset solumarkkerit, jotka tyypillisesti häviävät enukleaation jälkeen viimeisen erytroblastin jakautumisen jälkeen.

Polykromaattinen punasolu tai punasolun esiaste: äskettäin muodostunut punasolu kehityksen välivaiheessa, joka värjää siniset ja punaiset komponentit klassisessa veren värjäyksessä (kuten Wrightin-Giemsan värjäys), koska vasta muodostuneeseen soluun sisältyy RNA:ta. Tällaiset äskettäin muodostuneet solut ovat likimain samanlaisia kuin retikulosyytit, joita visualisoidaan käyttämällä vitaaliväriäystä aiheuttaen jäännöksenä olevan solun RNA:n kasautumisen retikulumiksi. Muita menetelmiä, kuten RNA:n yksiväristä värjäystä fluoresoivilla väreillä tai lyhytikäisten pintamarkkereiden, kuten CD71:n merkitsemistä fluoresoivilla vasta-aineilla käytetään tällä hetkellä usein tunnistamaan vasta muodostuneet punasolut. Polykromaattiset punasolut, retikulosyytit ja CD71-positiiviset punasolut ovat punasolujen esiasteita, vaikka jokaisella on hieman erilainen elinaikajakauma.

Retikulosyytti: vasta muodostunut punasolu, joka on värjätty vitaaliväriäyksellä aiheuttaen jäännöksenä olevan solun RNA:n kasautumisen retikulumiksi. Retikulosyyteillä ja polykromaattisilla punasoluilla on samanlainen solun ikäjakauma.

Sentromeeri: kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLTEN EROJEN TUNNISTAMISEKSI *IN VIVO* -MIKROTUMATESTISSÄ

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä kokeessa vähintään viisi urosta ja viisi naarasta testataan kullakin pitoisuustasolla. Tämä johtaa koemalliin, jossa on vähintään 40 eläintä (20 urosta ja 20 naarasta sekä asiaankuuluvat positiiviset kontrollit).

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisimmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuustaso ovat tärkeimmät vaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Tietoihin liittyvä vaihtelu ositetaan analyysissa sukupuolten ja pitoisuuksien väliseksi sekä sukupuolten ja pitoisuuksien väliseen yhdysvaikutukseen liittyväksi vaihteluksi. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutusyhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiiviisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä. Joissain kirjoissa annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka käyttävät mallintamiseen perustuvaa lähestymistapaa, kuten yleistettyjä lineaarisia malleja, voivat tarkastella analyysia erilaisella, mutta vertailukelpoisella tavalla, mutta eivät välttämättä tee päätelmiä perinteisestä ANOVA-taulukosta, jonka juuret juontuvat ennen tietokoneita kehitettyihin tilastotieteen laskennan algoritmisiin lähestymistapoihin.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc."

6) Poistetaan B osassa oleva B.15 luku.

7) Poistetaan B osassa oleva B.16 luku.

8) Poistetaan B osassa oleva B.18 luku.

9) Poistetaan B osassa oleva B.19 luku.

10) Poistetaan B osassa oleva B.20 luku.

11) Poistetaan B osassa oleva B.24 luku.

12) Korvataan B osassa oleva B.47 luku seuraavasti:

"B.47 **Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 437 (2013). Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä (BCOP) on arvioitu vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälisen koordinointikomitean (ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) toimesta. Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus (ECVAM) ja Japanin vastaava keskus (JaCVAM) vuosina 2006 ja 2010 (1) (2). Ensimmäisellä kerralla arvioitiin BCOP-testimenetelmän käytettävyyttä vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa (1). Toisella kerralla arvioitiin BCOP-testimenetelmän käytettävyyttä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa, joita ei luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (2). BCOP-validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 ainetta ja 100 seosta (2) (3). Arviointien ja niiden vertaisarvioiden perusteella katsottiin, että testimenetelmällä voidaan tunnistaa oikein sekä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (aineet ja seokset) (luokka 1) että sellaiset, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta siten, kun se on määritetty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS-järjestelmässä) (4) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetuksessa) ([1]), ja menetelmä on siten vahvistettu tieteellisesti päteväksi molempiin tarkoituksiin. Vakava silmävaurio on silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän pinnalle, eikä se palaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vakavan silmävaurion aiheuttavat testikemikaalit on luokiteltu YK:n GHS-luokkaan 1. Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on määritelty kemikaaleiksi, joita ei voida luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi, joten niitä kutsutaan kemikaaleiksi, joilla ei ole YK:n GHS-luokitusta. Tähän testimenetelmään kuuluvat BCOP-testimenetelmän suositeltu käyttö ja rajoitukset, jotka perustuvat BCOP:n arviointeihin. OECD:n testiohjeiden alkuperäisen vuoden 2009 version ja vuoden 2013 päivitetyn version tärkeimmät, mutta eivät ainoat, erot ovat: BCOP-testimenetelmän käyttö sellaisten kemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi YK:n GHS-järjestelmän luokitusta (2 ja 7 kohdat); tarkennukset BCOP-testimenetelmän soveltuvuuteen alkoholien, ketonien ja kiintoaineiden (6 ja 7 kohdat) sekä aineiden ja seosten (8 kohta) testaamisessa; tarkennukset pinta-aktiivisten aineiden ja pinta-aktiivisia aineita sisältävien seosten suositeltavaan testaustapaan (28 kohta); positiivisia kontrolleja koskevat päivitykset ja tarkennukset (39 ja 40 kohdat); BCOP-testimenetelmän päätösperusteiden päivitys (47 kohta); tutkimuksen hyväksymisperusteiden päivitys (48 kohta); testiraportin osien päivitys (49 kohta); lisäyksen 1 määritelmien päivitys; lisäykseen 2 lisätty maininta BCOP-testimenetelmän ennustamiskyvystä eri luokitusjärjestelmissä; lisäyksessä 3 olevan pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien luettelon päivitys sekä lisäyksen 4 päivitys BCOP-testissä käytetyn sarveiskalvotelineen (1 kohta) ja opasitometrin (2 ja 3 kohdat) osalta.

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

Nykyään on yleisesti hyväksyttyä, että Draizen *in vivo* -silmätestiä ei lähitulevaisuudessa voida korvata millään yksittäisellä *in vitro* -silmä-ärsytystestillä, kun halutaan ennakoida kaikki eri kemikaaliluokkien aiheuttamien aiheuttamat ärsytykset. Draizen silmätesti voidaan mahdollisesti kuitenkin korvata käyttämällä monen vaihtoehtoisen testimenetelmän (porrastettua) testausstrategiaa (5). Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (5) on tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella voidaan olettaa, että kemikaalin ärsytyskyky on korkea. Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa (5) on taasen tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella voidaan olettaa, että kemikaali ei aiheuta niin suurta silmä-ärsytystä, että se olisi luokiteltava. BCOP-testimenetelmä on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien silmävaarallisuuden luokitukseen ja merkintään. Vaikka BCOP-testimenetelmää ei pidetäkään yksinään luotettavana *in vivo* -kaninsilmätestin korvaavana testinä, sitä suositellaan Scott *et al.:n* ehdotuksen kaltaisen ylhäältä alaspäin suuntautuvan testausstrategian ensimmäiseksi vaiheeksi (5) käytettäväksi vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien eli YK:n GHS-luokkaan 1 luokiteltujen kemikaalien tunnistamisessa ilman lisätestejä (4). BCOP-testimenetelmää suositellaan myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (ei YK:n GHS-luokitusta) (4) osana ylhäältä alaspäin suuntautuvan lähestymistavan kaltaista testausstrategiaa (5). Lopullisen luokituksen vahvistamiseksi kemikaali, jonka ei ennusteta aiheuttavan vakavaa silmävaurioita tai jota ei ole luokitettu BCOP-testimenetelmällä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on kuitenkin testattava (*in vitro* ja/tai *in vivo*) lisätesteillä.

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin mahdollinen vaarallisuus silmälle mittaamalla kykyä aiheuttaa sameutta ja läpäisevyyden lisääntymistä eristetyssä naudan sarveiskalvossa. Myrkylliset vaikutukset sarveiskalvoon mitataan seuraavilla menetelmillä: i) valo läpikulun (transmission) vähentyminen (sameus) ja ii) natriumfluoreseiini-väriaineen lisääntynyt siirtyminen silmään (läpäisevyys). Testikemikaalille altistuksen jälkeen tehtyjä sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyysarviointeja tarkastellaan yhdessä siten, että voidaan johtaa *in vitro -ärsyttävyysarvo* (*In vitro* Irritancy Score, IVIS), jonka avulla luokitellaan testikemikaalin ärsyttävyystaso.

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin ICE-testimenetelmäprotokollaan (6) (7), joka kehitettiin alun perin *In vitro* -tieteiden instituutin (IIVS) protokollasta ja INVITTOX-protokollasta 124 saatujen tietojen pohjalta (8). Viimeksi mainittua käytettiin Euroopan yhteisöjen rahoittamassa validointia edeltävässä tutkimuksessa vuosina 1997–1998. Molemmat protokollat perustuivat BCOP-testimenetelmään, jonka raportoivat ensimmäisenä Gautheron *et al.* (9)

BCOP-testimenetelmää voidaan YK:n GHS-järjestelmän mukaan vakavan silmävaurion aiheuttavaksi kemikaaliksi määritettyjen kemikaalien eli YK:n GHS-luokkaan 1 luokiteltujen kemikaalien tunnistamiseen (4). Tähän käyttötarkoitukseen käytettynä BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 79 % (150/191), väärien positiivisten tulosten osuus 25 % (32/126) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 14 % (9/65) verrattuna kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testimenetelmällä saatuihin tietoihin luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti (3) (ks. lisäys 2,

taulukko 1). Kun tiettyihin kemiallisiin luokkiin (kuten alkoholit, ketonit) tai fysikaalisiin luokkiin (kuten kiintoaineet) kuuluvat testikemikaalit poistetaan tietokannasta, BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 85 % (111/131), väärien positiivisten tulosten osuus 20 % (16/81) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 8 % (4/50) luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti (3). BCOP-testimenetelmän mahdolliset puutteet vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa (YK:n GHS-luokka 1) johtuvat validointitietokannassa havaittujen alkoholien ja ketonien korkeasta väärien positiivisten tulosten määrästä ja kiintoaineiden korkean väärien negatiivisten tulosten määrästä (1) (2) (3). Koska kaikkia alkoholeja ja ketoneja ei kuitenkaan yliennusteta BCOP-testimenetelmässä, ja jotkin tunnistetaan oikein YK:n GHS-luokkaan 1 kuuluviksi, näiden orgaanisten funktionaalisten ryhmien ei katsota olevan testimenetelmän soveltamisalan ulkopuolella. Testimenetelmän käyttäjä voi päättää, onko alkoholien tai ketonien mahdollinen yliedustus hyväksyttävissä vai onko todistusnäytön perusteella tehtävä lisätestejä. Kiintoaineiden väärien negatiivisten tulosten osalta on huomattava, että kiintoaineet voivat aiheuttaa Draizen *in vivo* -silmä-ärsytystestissä erilaisia vaihtuvia ja äärimmäisiä altistumisolosuhteita, mistä voi aiheutua epäolennaisia johtopäätöksiä niiden todellisesta ärsyttävyydestä (10). On myös syytä huomata, että mikään ICCVAMin validointitietokannassa havaituista vakavan silmävaurion aiheuttavia kemikaaleja (YK:n GHS-luokkaa 1) koskevista vääristä negatiivisista tuloksista (2) (3) ei ollut sellainen, jossa IVIS-arvo olisi ollut ≤ 3, mikä on vaatimus sille, että testikemikaalin luokaksi voidaan määrittää ”ei YK:n GHS-luokitusta”. BCOP-testin väärät negatiiviset tulokset eivät tässä haittaa senkään vuoksi, koska kaikki testikemikaalit, joiden testituloksena on 3 < IVIS ≤ 55 testattaisiin myöhemmin muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai viimeisenä vaihtoehtona kaneilla sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Koska jotkin kiinteät kemikaalit tunnistetaan BCOP-testimenetelmässä oikein YK:n GHS-luokkaan 1 kuuluviksi, tämän fysikaalisen olomuodon ei katsota olevan testimenetelmän soveltamisalan ulkopuolella. Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille kemikaaleille, jolloin IVIS-arvon > 55 katsottaisiin viittaavan vakavaan silmävaurioon, jolloin kemikaali olisi luokiteltava ilman lisätestausta YK:n GHS-luokkaan 1. Alkoholeilla ja ketoneilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuten sanottu kuitenkin suhtauduttava varovaisesti mahdollisesti yliennustuksen vaaran takia.

BCOP-testimenetelmää voi käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (4). Tähän käyttötarkoitukseen käytettynä BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 69 % (135/196), väärien positiivisten tulosten osuus 69 % (61/89) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 % (0/107) verrattuna kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testimenetelmällä saatuihin tietoihin luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti (3) (ks. lisäys 2, taulukko 2). Väärien negatiivisten tulosten määrä (*in vivo* -testin kemikaalit, joilla ei YK:n GHS-luokitusta ja joiden IVIS-arvo on >3, ks. 47 kohta) on huomattavan suuri, mutta se ei haittaa tässä, koska kaikki testikemikaalit, joiden testituloksena on 3 < IVIS ≤ 55 testattaisiin myöhemmin muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai viimeisenä vaihtoehtona kaneilla sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. BCOP-testimenetelmässä ei ole havaittu erityisiä puutteita alkoholien, ketonien ja kiintoaineiden testauksessa, kun tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (3). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille kemikaaleille, jolloin negatiivisen tuloksen (IVIS ≤ 3) katsottaisiin viittaavan siihen, että kemikaali ei vaadi luokitusta (”ei YK:n GHS-luokitusta”). Koska BCOP-testimenetelmällä voidaan tunnistaa oikein vain 31 % sellaisista kemikaaleista, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, tämän testimenetelmän ei pitäisi olla ensisijainen menetelmä alhaalta ylös suuntautuvan lähestymistavan ensimmäisenä testinä (5), jos käytettävissä on muita validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* -menetelmiä, joiden herkkyys on yhtä korkea ja erittelykyky korkeampi.

BCOP-validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 ainetta ja 100 seosta (2) (3). BCOP-testausmenetelmää pidetään siten sopivana sekä aineiden että seosten testaukseen.

BCOP-testimenetelmää ei suositella sellaisten testikemikaalien tunnistamiseen, jotka olisi luokiteltava silmiä ärsyttäväksi (YK:n GHS-luokka 2 tai luokka 2A) tai sellaisten testikemikaalien, jotka olisi luokiteltava lievästi silmiä ärsyttäväksi (YK:n GHS-luokka 2B), koska huomattava määrä YK:n GHS-luokan 1 kemikaaleja luokitellaan liian alhaiseen GHS-luokkaan 2, 2A tai 2B, ja kemikaalit, joille ei ole YK:n GHS-luokitusta, luokitellaan liian korkeaan GHS-luokkaan 2, 2A tai 2B (2),(3). Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

Kaikissa naudan silmiä ja sarveiskalvoja käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennaltavarautumiskäytänteitä (11).

Vaikka BCOP-testimenetelmässä ei tarkastellakaan sidekalvon ja värikalvon vaurioita, siinä tutkitaan vaikutuksia sarveiskalvoon, jotka ovat YK:n GHS-luokituksen kannalta merkittävin *in vivo* -tekijä. BCOP-testimenetelmässä ei *sinänsä* voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta. Kaninsilmätutkimusten perusteella on myös ehdotettu, että sarveiskalvovaurion alkusyvyyden avulla voidaan tunnistaa jotkin palautumattomat vaikutukset (12). Tarvitaan kuitenkin lisää tieteellistä tietoa siitä, miten syntyvät ne palautumattomat vaikutukset, jotka eivät liity suureen alkuvaurioon. BCOP-testimenetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä toksisuutta.

Tätä testimenetelmää päivitetään aika ajoin sitä mukaa, kun saadaan uusia tietoja. Esimerkiksi histopatologiset tutkimukset voivat olla hyödyllisiä, jos sarveiskalvon vauriota on luonnehdittava tarkemmin. Kuten OECD:n ohjeasiakirjassa nro 160 (13) esitetään, käyttäjiä kehotetaan säilyttämään sarveiskalvot ja valmistelemaan histopatologisia näytteitä, joiden perusteella voidaan laatia tietokanta ja päätösperusteet, joiden avulla voidaan parantaa tämän testimenetelmän tarkkuutta.

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 3 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä BCOP-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa BCOP-testimenetelmästä saatuja tietoja sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

BCOP-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa naudan sarveiskalvon tavanomaisten fysiologisten ja biokemiallisten toimintojen lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro* -oloissa. Testikemikaalin aiheuttamaa vauriota arvioidaan tässä menetelmässä mittaamalla muutokset sarveiskalvon sameudessa ns. opasitometrillä ja muutokset läpäisevyydessä näkyvää valoa mittaavalla spektrofotometrillä. Molempia mittauksia käytetään IVIS-arvon laskemiseen. IVIS-arvon avulla osoitetaan aineelle *in vitro* -ärsyttävyyteen perustuva vaaraluokituskategoria, jotta voidaan ennustaa testiaineen *in vivo* -silmä-ärsytyskyky (ks. päätösperusteet, 48 kohta).

BCOP-testimenetelmässä käytetään vasta teurastetuista naudoista saaduista silmistä eristettyjä sarveiskalvoja. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy koko sarveiskalvon läpi ja joka mitataan takakammiossa olevassa mediumissa (väliaineessa). Testikemikaalit annostellaan sarveiskalvon epiteelipinnalle lisäämällä sitä sarveiskalvotelineen etukammioon. Lisäyksessä 4 on kuvaus ja kaavio BCOP-testimenetelmässä käytetystä sarveiskalvotelineestä. Sarveiskalvotelineitä saa kaupallisesti eri lähteistä, tai ne voi rakentaa itse.

Naudan silmien lähde ja eläinten ikä sekä eläinlajin valinta

Teurastamoihin tuodut nautaeläimet teurastetaan useimmiten käytettäväksi ihmisravinnoksi tai muihin kaupallisiin tarkoituksiin. BCOP-testimenetelmään voidaan käyttää vain sarveiskalvoja, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä. Koska nautaeläinten paino vaihtelee paljon riippuen rodusta, iästä ja sukupuolesta, ei anneta mitään suositusta siitä, minkä painoisia eläinten olisi oltava teurastushetkellä.

Sarveiskalvojen mitat voivat vaihdella käytettäessä eri ikäisistä eläimistä saatuja silmiä. Yli kahdeksan vuoden ikäisistä eläimistä saatujen sarveiskalvojen halkaisija vaakasuunnassa on yleensä >30,5 mm ja sarveiskalvon keskiosan paksuus (CCT) ≥ 1100 µm, kun taas alle viiden vuoden ikäisten sarveiskalvon halkaisija on 28,5 mm ja CCT < 900 µm (14). Tästä syystä ei yleensä käytetä silmiä, jotka on saatu yli 60 kuukauden ikäisistä eläimistä. Perinteisesti ei ole käytetty alle 12 kuukauden ikäisten nautojen silmiä, koska silmien kehitys on vielä kesken ja sarveiskalvo on huomattavasti ohuempi ja sen halkaisija pienempi kuin täysikasvuisten eläinten sarveiskalvon. Nuorista eläimistä (*eli* 6–12 kuukautta vanhoista) saatuja sarveiskalvoja voidaan käyttää, koska siihen liittyy joitakin etuja. Niitä saa helpommin, ikävaihtelu on pienempi, ja vaara työntekijöiden altistumisesta naudan spongiformiselle enkefalopatialle on pienempi (15). Koska olisi hyödyllistä arvioida lisää sarveiskalvon koon tai paksuuden vaikutusta sarveiskalvon reagoimiseen syövyttäviin ja ärsyttäviin kemikaaleihin, käyttäjiä kehotetaan raportoimaan niiden eläinten arvioitu ikä ja/tai paino, joista tutkimuksessa käytetyt sarveiskalvot on saatu.

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

Teurastamon henkilökunta kerää silmät. Silmien mekaanisten ja muiden vaurioiden ehkäisemiseksi silmät olisi poistettava silmästä mahdollisimman pian kuoleman jälkeen, ja ne olisi pantava jäähdytykseen heti silmämunasta poistamisen jälkeen ja kuljetuksen ajaksi. Jotta silmät eivät altistuisi mahdollisesti ärsyttäville kemikaaleille, teurastamon työntekijät eivät saisi käyttää detergenttejä huuhtoessaan eläimen päätä.

Silmät olisi upotettava kokonaan jäähdytettyyn Hanksin suolaliuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) sopivankokoisessa astiassa ja kuljetettava laboratorioon sellaisella tavalla, että bakteerikontaminaatio tai muut vauriot ovat mahdollisimman pieniä. Koska silmät kerätään teurastuksen yhteydessä, niihin saattaa roiskua verta ja muita biologisia aineita, kuten bakteereja ja muita pieneliöitä. Siksi on tärkeää varmistaa, että kontaminaatioriski on mahdollisimman pieni. *Esimerkiksi* astia, jossa silmät ovat, on pidettävä jäähauteessa, ja kuljetusta varten käytettävään HBSS:ään on lisättävä antibiootteja (esim. penisilliiniä 100 IU/ml ja streptomysiiniä 100 µg/mL]).

Silmien keräämisen ja BCOP-testin tekemisen välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (keräys ja käyttö mieluiten samana päivänä), ja pitäisi osoittaa, etteivät määritystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vasteisiin. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

BCOP-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

Heti kun silmät saapuvat laboratorioon, tutkitaan huolellisesti, onko niissä vikoja, kuten lisääntynyttä sameutta, naarmuja ja verisuonittumista. Testissä saa käyttää vain sellaisista silmistä saatuja sarveiskalvoja, joissa ei ole tällaisia vikoja.

Kaikkien sarveiskalvojen laatua arvioidaan myös määrityksen myöhemmissä vaiheissa. Sarveiskalvot, joiden sameus on tunnin tasapainottumisajan jälkeen yli seitsemän sameusyksikköä tai opasitometrin ja sarveiskalvotelineen vastaavaa yksikköä, on hylättävä (HUOMAUTUS: opasitometri olisi kalibroitava sameusyksikköjen määrittelemiseen käytettävien sameusstandardien mukaisesti, ks. lisäys 4).

Kussakin käsittelyryhmässä (testikemikaali, samaan aikaan tehtävät negatiiviset ja positiiviset kontrollit) on oltava vähintään kolme silmää. BCOP-testauksessa pitäisi negatiiviseen kontrolliin käyttää kolme sarveiskalvoa. Koska kaikki sarveiskalvot leikataan kokonaisesta silmämunasta ja asetetaan sarveiskalvokammioihin, voi käsittelystä aiheutua vahinkoa, joka vaikuttaa yksittäisen sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen (myös negatiivisessa kontrollissa). Negatiivisista kontrollisarveiskalvoista saatuja sameus- ja läpäisevyysarvoja käytetään lisäksi IVIS-laskelmissa korjaamaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja positiivisella kontrollilla käsiteltyjen sarveiskalvojen sameus- ja läpäisevyysarvoja.

MENETTELY

Silmien valmistelu

Virheettömät sarveiskalvot leikataan siten, että niihin jää 2–3 mm:n reuna kovakalvoa, mikä helpottaa myöhempää käsittelyä. Varotaan vahingoittamasta sarveiskalvon epiteeliä ja endoteeliä. Eristetyt sarveiskalvot asetetaan erikoistelineisiin, joissa on etu- ja takaosasto. Nämä ovat kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuoleen (etukammio) ja endoteelipuoleen (takakammio). Molemmat kammiot täytetään ylimäärin esilämmitetyllä Eaglen Minimum Essential Medium (EMEM) -viljelynesteellä (mediumilla), jossa ei ole fenolipunaa (takakammio ensin) ja varmistetaan, ettei muodostu kuplia. Laitteen annetaan tasapainottua 32 ± 1 celsiusasteessa vähintään tunnin, jotta sarveiskalvot tasapainottuvat mediumin kanssa ja niiden metabolinen toiminta palautuu normaaliksi (mikäli mahdollista). Sarveiskalvon pinnan lämpötila *in vivo* on noin 32 °C.

Tasapainottumisjakson jälkeen molempiin kammioihin lisätään tuoretta esilämmitettyä EMEM:iä, jossa ei ole fenolipunaa, ja kustakin sarveiskalvosta otetaan sameuden perustasolukema. Sarveiskalvot, joissa ilmenee makroskooppista kudosvauriota (kuten naarmuja, pigmentaatiota tai verisuonittumista) tai joiden sameus on yli seitsemän sameusyksikköä tai opasitometrin ja sarveiskalvotelineen vastaavaa yksikköä, on hylättävä. Negatiiviseksi kontrolliryhmäksi (tai liuotinkontrolliryhmäksi) valitaan vähintään kolme sarveiskalvoa. Muut sarveiskalvot jaetaan käsittelyryhmään ja positiivisen kontrollin ryhmään.

Koska veden lämpökapasiteetti on suurempi kuin ilman, vedellä saadaan tasaisempi inkubaatiolämpötila. Siksi suositellaan vesihauteen käyttöä sarveiskalvotelineen ja sen sisällön pitämiseksi 32 ± 1 celsiusasteessa. Kuitenkin myös ilmainkubaattoreita voidaan käyttää, kunhan huolehditaan siihen, että lämpötila pysyy vakaana (esimerkiksi esilämmittämällä telineet ja mediumit).

Testikemikaalin annostelu

Käsittelyä varten on kaksi eri protokollaa, toinen nesteille ja pinta-aktiivisille aineille (kiinteät tai nestemäiset) ja toinen kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia.

Nesteet testataan laimentamattomina. Puoliksi kiinteät aineet, voiteet ja vahat testataan tavallisesti kuten nesteet. Pinta-aktiiviset aineet testataan 10-prosenttisena liuoksena (w/v) 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Jos laimennuksia muutetaan, on ne perusteltava. Pinta-aktiivisia aineita sisältävät teokset voidaan testata laimentamattomina tai sopivaksi pitoisuudeksi laimennettuna riippuen kysymykseen tulevasta *in vivo* -altistusskenaariosta. Jos pitoisuuksia muutetaan, on ne perusteltava. Sarveiskalvot altistetaan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille 10 minuutin ajan. Jos altistusaikaa muutetaan, olisi se perusteltava tieteellisesti. Lisäyksessä 1 on pinta-aktiivisen aineen ja pinta-aktiivista ainetta sisältävän seoksen määritelmät.

Kiinteät aineet, jotka eivät ole pinta-aktiivisia, testataan tavallisesti 20-prosenttisena liuoksena (w/v) tai suspensiona 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Joissakin olosuhteissa ja asianmukaisesti tieteellisesti perusteltuna kiinteitä aineita voidaan testata myös sellaisenaan annostelemalla niitä suoraan sarveiskalvon pinnalle avoimen kammion menetelmässä (ks. 32 kohta). Sarveiskalvot altistetaan kiinteille aineille neljän tunnin ajan. Kuten nesteiden ja pinta-aktiivisten aineiden tapauksessa, altistusajan muuttaminen on perusteltava tieteellisesti.

Käsittely voi olla erilaista riippuen testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista, esimerkiksi siitä, onko kyseessä kiinteä aine, neste, viskoosi tai ei-viskoosi neste. Tärkeintä on varmistaa, että testikemikaali peittää riittävästi epiteelin pinnan ja että se voidaan huuhtelemalla poistaa riittävästi. Suljetun kammion menetelmää käytetään tavallisesti testattaville nestemäisille kemikaaleille, jotka vaihtelevat ei-viskoosista lievästi viskoosiin, kun taas avoimen kammion menetelmää käytetään tavallisesti puoliksi viskooseille ja viskooseille nestemäisille testikemikaaleille ja kiinteille aineille.

Suljetun kammion menetelmässä annostellaan etukammioon niin paljon testikemikaalia (750 µl), että se peittää sarveiskalvon epiteelipuolen. Annostelu tapahtuu kammion yläosassa olevien aukkojen kautta. Aukot suljetaan sitten tulpilla altistuksen ajaksi. On tärkeää varmistaa, että kukin sarveiskalvo altistetaan testiaineelle niin pitkäksi aikaa kuin on asianmukaista.

Avoimen kammion menetelmässä ikkunan lukitusrengas ja etukammion lasi-ikkuna poistetaan ennen käsittelyä. Kontrollia tai testikemikaalia (750 µl tai niin paljon, että testikemikaali peittää sarveiskalvon kokonaan) annostellaan suoraan sarveiskalvon epiteelipinnalle mikropipetillä. Jos testikemikaalia on vaikea annostella pipetillä, annostelua voidaan helpottaa siirtämällä testikemikaali positive displacement -pipettiin paineen avulla. Positive displacement -pipetin kärki työnnetään ruiskun annostelukärkeen niin, että aine voidaan siirtää displacement-pipetin kärkeen paineen avulla. Ruiskun mäntää painetaan samalla kun pipetin mäntää vedetään ylöspäin. Jos pipetin kärkeen ilmestyy ilmakuplia, testiaine puhalletaan ulos ja prosessi toistetaan, kunnes kärki saadaan täytettyä ilman ilmakuplia. Jos on tarpeen, voidaan käyttää tavallista ruiskua (ilman neulaa), koska sillä voidaan mitata tarkka tilavuus testikemikaalia, ja annostelu sarveiskalvon epiteelipinnalle on helpompaa. Annostelun jälkeen lasi-ikkuna pannaan paikalleen etukammion päälle, jotta järjestelmä on jälleen suljettu.

Inkubointi altistuksen jälkeen

Altistusajan jälkeen testikemikaali, negatiivinen kontrollikemikaali tai positiivinen kontrollikemikaali poistetaan etukammiosta ja epiteeli pestään vähintään kolmesti (tai kunnes testikemikaalia ei näy) EMEM:illä (jossa on fenolipunaa). Huuhteluun käytetään fenolipunaa sisältävää mediumia, koska fenolipunan värin vaihtumista voidaan seurata, kun halutaan määrittää happamien tai emäksisten testikemikaalien huuhtelun tehokkuus. Sarveiskalvoja pestään enemmän kuin kolme kertaa, jos fenolipuna on edelleen vääränvärinen (keltainen tai purppuranvärinen) tai jos testikemikaalia on vielä näkyvillä. Kun mediumissa ei ole enää testikemikaalia, sarveiskalvot pestään vielä kerran EMEM:illä (jossa ei ole fenolipunaa). EMEM-huuhtelua (ilman fenolipunaa) käytetään viimeiseksi sen varmistamiseksi, että fenolipuna on poistunut etukammiosta ennen sameusmittausta. Etukammio täytetään sitten uudelleen tuoreella EMEM:illä (ilman fenolipunaa).

Kun testikemikaali on neste tai pinta-aktiivinen aine, sarveiskalvoja inkuboidaan huuhtelun jälkeen vielä kaksi tuntia 32 ± 1 celsiusasteessa. Tietyissä olosuhteissa voi pitempi aika altistuksen jälkeen olla hyödyksi. Sitä voidaan harkita tapauskohtaisesti. Kiinteillä aineilla käsitellyt sarveiskalvot huuhdellaan perusteellisesti neljän tunnin altistuksen päätteeksi, mutta niitä ei tarvitse enää inkuboida enempää.

Kunkin sarveiskalvon sameus ja läpäisevyys kirjataan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille altistuksen jälkeisen inkubaation jälkeen ja kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia aineita, neljän tunnin altistuksen jälkeen. Kutakin sarveiskalvoa tarkastellaan myös silmämääräisesti ja kirjataan merkitykselliset havainnot (esimerkiksi kudoksen kuoriutuminen, testikemikaalin jäämät, epätasainen sameusjakauma). Tällaiset havainnot voivat olla tärkeitä, sillä ne voivat näkyä opasitometrin lukemien vaihteluna.

Kontrollikemikaalit

Kussakin kokeessa on mukana samanaikaisesti määritettävät negatiiviset eli liuotin/kantaja-ainekontrollit ja positiiviset kontrollit.

Kun testataan 100-prosenttista nestemäistä ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä negatiivinen kontrolli (esimerkiksi 0,9-prosenttinen natriumkloridiliuos tai tislattu vesi) sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Näin varmistetaan myös, etteivät määritysolosuhteet aiheuta ärsytysvastetta tahattomasti.

Kun testataan laimennettua nestettä, pinta-aktiivista ainetta tai kiinteää ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä liuotin/kantaja-ainekontrolliryhmä sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Liuotinta/kantaja-ainetta saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan positiivisena kontrollina kemikaali, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen, jotta voidaan varmistaa testijärjestelmän vahingoittumattomuus ja sen moitteeton toiminta. Ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan määrittää.

Esimerkkejä nestemäisten testikemikaalien positiivisista kontrolleista ovat 100-prosenttinen etanoli tai 100-prosenttinen dimetyyliformamidi. Esimerkki kiinteiden testikemikaalien positiivisesta kontrollista on 20-prosenttisena liuoksena (w/v) oleva imitsadoli 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa.

Vertailukemikaalit ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Sarveiskalvon sameus mitataan kvantitatiivisesti opasitometrillä, jolla saadaan jatkuvalla asteikolla mitattuja sameusarvoja.

Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy kaikkien sarveiskalvon solukerrosten (*ts.* sarveiskalvon ulkopinnan epiteelin ja sisäpinnan endoteelin) läpi. 1 ml natriumfluoreseiiniliuosta (4 mg/ml testattaessa nesteitä tai pinta-aktiivisia aineita tai 5 mg/ml testattaessa kiinteitä aineita, jotka eivät ole pinta-aktiivisia) lisätään sarveiskalvotelineen etukammioon, joka on kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuolen kanssa. Takakammiossa, joka on kosketuksissa sarveiskalvon endoteelipuolen kanssa, on tuoretta EMEM:iä. Telinettä inkuboidaan vaakasuorassa 90 ± 5 min 32 ± 1 celsiusasteessa. Takakammioon siirtyvän natriumfluoreseiinin määrä mitataan UV/VIS-spektrofotometrillä. 490 nanometrin aallonpituudella mitatut spektrofotometrin lukemat kirjataan optisena tiheytenä (OD490) tai absorbanssiarvoina, jotka mitataan jatkuvalla asteikolla. Fluoreseiiniläpäisevyysarvot määritetään käyttäen OD490-arvoja, jotka on mitattu spektrofotometrillä tavanomaisella 1 senttimetrin valotiellä.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää 96 kuopan kuoppalevyjen lukulaitetta, jos i) laitteen fluoreseiinin OD490 -arvojen mittausalue on lineaarinen; ja ii) 96 kuopan levyissä käytetään sellaista fluoreseiininäytteiden tilavuutta, jolla saadaan 1 cm:n valotiellä saatuja arvoja vastaavat OD490 -arvot (tämä saattaa edellyttää, että kuoppa täytetään kokonaan [tavallisesti 360 µl).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Kun sameusarvot ja keskimääräiset läpäisevyysarvot (OD490) on korjattu taustan sameuden ja negatiivisen kontrollin läpäisevyyden OD490-arvojen suhteen, yhdistetään kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskimääräiset OD490-arvot kokemusperäiseen kaavaan, josta lasketaan kullekin käsittelyryhmälle *in vitro* -ärsytysaste (IVIS) seuraavasti:

IVIS = sameuden keskiarvo + (15 × keskimääräinen läpäisevyyden OD490-arvo)

Sina *et al.* (16) ovat raportoineet, että tämä kaava on johdettu heidän laboratoriossaan ja laboratorioidenvälisissä tutkimuksissa. Monilaboratoriotutkimuksessa 36 yhdisteen sarjalle saaduille tuloksille tehtiin monimuuttuja-analyysi, jossa määritettiin paras yhtälö *in vivo* ja *in vitro* saatujen tuloksien välille. Kahden eri yhtiön tutkijat toistivat analyysin ja saivat lähes samat yhtälöt.

Sameus- ja läpäisevyysarvoja olisi arvioitava myös erikseen, jotta nähdään, aiheuttaako testikemikaali syövytystä tai vakavaa ärsytystä vain yhden päätepisteen määrityksessä (ks. päätösperusteet).

Päätösperusteet

Seuraavassa on esitetty IVIS-raja-arvot, joiden avulla voidaan tunnistaa sellaiset kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-luokka 1), sekä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (kemikaalit, joilla ei ole YK:n GHS-luokitusta):

IVIS	YK:n GHS
≤ 3	Ei luokitusta
> 3; ≤ 55	Ennusteita ei voida tehdä
> 55	Luokka 1

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivisella kontrollilla saadaan IVIS-arvo, joka on kahden standardipoikkeaman sisällä senhetkisestä pitkän aikavälin keskiarvosta, joka on päivitettävä vähintään kolmen kuukauden välein tai joka kerta kun sellaisissa laboratorioissa, joissa testejä tehdään vain harvoin (*eli* vähemmän kuin kerran kuussa) saadaan hyväksytty testi. Negatiivisista tai liuotin/kantaja-ainevasteista saatujen sameus- ja läpäisevyysarvojen pitäisi olla pienemmät kuin vahvistetut sameuden ja läpäisevyyden taustaraja-arvot naudan sarveiskalvolle, jota on käsitelty negatiivisilla tai liuotin/kantaja-ainekontrolleilla. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kolme sarveiskalvoa käsittävässä testiajossa. Jos ensimmäisen testiajon tulokset ovat moniselitteisiä, on harkittava toista testiajoa (se ei kuitenkaan ole välttämätöntä) ja kolmatta, jos ensimmäisen ja toisen testiajon keskimääräiset IVIS-tulokset ovat ristiriitaisia. Ensimmäisen testiajon tuloksia pidetään moniselitteisinä, jos kolmen sarveiskalvon ennusteet ovat ristiriitaisia, kuten

— jos kaksi kolmesta sarveiskalvosta tuotti kaikkien kolmen sarveiskalvon keskiarvosta poikkeavia ennusteita TAI

— jos yksi kolmesta sarveiskalvosta tuotti kaikkien kolmen sarveiskalvon keskiarvosta poikkeavan ennusteen JA poikkeava ennuste oli > 10 IVIS-yksikköä kynnysarvosta 55.

— Jos uusi testiajo vahvistaa alkuperäisen testiajon (keskimääräiseen IVIS-arvoon pohjautuvan) ennusteen, lopullinen päätös voidaan tehdä ilman lisätestejä. Jos uusi testiajo tuottaa alkuperäisestä testiajosta poikkeavan (keskimääräiseen IVIS-arvoon pohjautuvan) ennusteen, yksiselitteisten ennusteiden saamiseksi ja testikemikaalin luokittelemiseksi olisi tehtävä kolmas ja viimeinen testiajo. Jos jokin testiajo tuottaa YK:n GHS-luokan 1 ennusteen, luokitus ja merkintä voidaan tehdä ilman lisätestejä.

Testiraportti

Testiraportissa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan CAS-numero, jos se tunnetaan

— testi/kontrollikemikaalin puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (*esimerkiksi* lämmittäminen tai jauhaminen)

— stabiilius, jos se tiedetään.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja.

Testiolosuhteet:

— käytetty opasitometri (esim. malli ja erittelyt) ja välineiden kokoonpano

— sameuden ja läpäisevyyden mittaukseen käytettyjen laitteiden (esimerkiksi opasitometrin ja spektrofotometrin) kalibrointitiedot, jotta voidaan varmistaa mittausten lineaarisuus

— käytettyjen sarveiskalvotelineiden tyyppi (esim. malli ja erittelyt)

— kuvaus muista käytetyistä laitteista

— menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (*eli* tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittämiseen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus).

Hyväksyttävän testin perusteet

— hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit

— tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Silmien kerääminen ja valmistelu

— silmien lähteen tunnistustiedot (*esim.* laitos, josta ne on kerätty)

— sarveiskalvon halkaisija, jonka perusteella määritetään sen eläimen ikä, josta se on peräisin, sekä sen soveltuvuus testiin

— silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika siihen asti kun testi aloitettiin, kuljetuksessa käytetty medium ja lämpötilaolot, mahdollisesti käytetyt antibiootit)

— naudan sarveiskalvojen valmistelu ja paikalleen asettaminen, myös niiden laatua koskeva lausuma, sarveiskalvotelineen lämpötila ja testauksessa käytettävien sarveiskalvojen valintaperusteet.

Testimenettely

— rinnakkaisnäytteiden määrä

— käytetyt negatiiviset ja positiiviset kontrollit (ja mahdolliset liuotin- ja vertailukontrollit)

— käytettyjen testikemikaalien pitoisuus (pitoisuudet), annostelu, altistusaika ja altistuksen jälkeinen inkubaatioaika

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimuksen hyväksymiskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä päätöskriteereistä.

Tulokset

— taulukko tuloksista, jotka on saatu yksittäisistä testinäytteistä (esimerkiksi sameus ja OD490-arvot ja lasketut IVIS-arvot testikemikaaleille sekä positiivisille, negatiivisille ja vertailukontrolleille [jos mukana] taulukkomuodossa, myös tulokset toistetuista kaksoismäärityksistä tapauksen mukaan, sekä keskiarvot ± standardipoikkeamat kullekin kokeelle

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista

— mahdollinen *in vitro* -testillä laskettu YK:n GHS-järjestelmän mukainen luokitus.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Current Validation Status of *In vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) YK (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. ja the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla osoitteessa http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf.

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Toxicol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, nro 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. ja Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. ja Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. ja Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Tässä liitteessä oleva B.5 kappale Acute eye irritation/corrosion.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm.

(19) OECD (1998) Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (tarkistettu 1997).

Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, jotka sisältävät kaikki pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja tuotantotoiminnassa muodostuvat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (4).

Ei luokiteltu: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen (YK:n GHS-luokka 2, 2A tai 2B) tai vakavan silmävaurion (YK:n GHS-luokka 1) osalta. Sama kuin "Ei YK:n GHS-luokitusta".

Ei YK:n GHS-luokitusta: Kemikaalit, joita ei voida luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi. Sama kuin "Ei luokiteltu".

***In vitro* ärsytysarvo (*In vitro* Irritancy Score, IVIS)**: BCOP-testimenetelmässä käytetty empiirisesti johdettu kaava, jossa kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskiarvot yhdistetään yhteen *in vitro* -arvoon. *IVIS* = sameuden keskiarvo + (15 × keskimääräinen läpäisevyysarvo)

Jäsentävä lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (positiivinen tulos) ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Kokoava lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaalia ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella (negatiivinen tulos) ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Korjautuvat vaikutukset silmiin: Ks. "Silmä-ärsytys".

Liuotin/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Opasitometri: Laite, jolla mitataan sarveiskalvon sameutta arvioimalla kvantitatiivisesti valon kulkeminen sarveiskalvon läpi. Opasitometrissä on tyypillisesti kaksi osastoa, joista kussakin on oma valonlähde ja valokenno. Toista osastoa käytetään käsitellylle sarveiskalvolle ja toista laitteen kalibrointiin ja nollaamiseen. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita; tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

Pinta-aktiivista ainetta sisältävä seos: Tämän testimenetelmän yhteydessä seos, joka sisältää yhden tai useamman pinta-aktiivisen aineen, jonka lopullinen pitoisuus on > 5 %.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Positiivinen vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Pysyvät vaikutukset silmiin: Ks. ”Vakava silmävaurio”.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon läpäisevyys: Sarveiskalvon epiteelin vaurion mitta, jota varten määritetään kaikkien sarveiskalvon solukerrosten läpi menneen fluoreseiini-väriaineen määrä.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota. Sameus voidaan arvioida subjektiivisesti Draizen kaninsilmätestillä tai objektiivisesti jollain laitteella, kuten ”opasitometrillä”.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta, jotka eivät reagoi keskenään (4).

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”Korjautuvat vaikutukset silmiin” ja ”YK:n GHS-luokka 2” (4).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää testikemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (’agentin’) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”Pysyvät vaikutukset silmiin” ja ”YK:n GHS-luokka 1” (4).

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Vertailukemikaali: Kemikaali, johon testikemikaalia verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvästä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineryhmän kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja, ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien negatiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

YK:n GHS-luokka 1: Ks. ”Vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-luokka 2: Ks. ”Silmä-ärsytys”.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (4).

Lisäys 2

BCOP-TESTIMENETELMÄN ENNUSTAMISKYKY

Taulukko 1

BCOP-menetelmän ennustamiskyky vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa [YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-asetuksen luokka 1 vs Ei-luokiteltu 1 (luokka 2 + ei luokiteltu); US EPA -luokka I vs Ei-luokiteltu I (luokka II + luokka III + luokka IV)]

Luokitus Järjes-telmä	Nro	Tarkkuus		Herkkyys		Väärä negatiivinen		Spesifisyys		Väärä positiivinen	
		%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro
YK:n GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Taulukko 2

BCOP-menetelmän ennustamiskyky sellaisten kemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (”ei-ärsyttävät”) [YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-asetuksen luokka Ei-luokiteltu vs Ei ei-luokiteltu (luokka 1 + luokka 2); US EPA -luokka IV vs Ei luokiteltu IV (luokka I + luokka II + luokka III)]

Luokitus Järjes-telmä	Nro	Tarkkuus		Herkkyys		Väärä negatiivinen		Spesifisyys		Väärä positiivinen	
		%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro
YK:n GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Lisäys 3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT BCOP-TESTIMENETELMÄLLE

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen olisi osoitettava teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 13 kemikaalin silmävaarallisuusluokitus. Kemikaalit valittiin sen mukaan, että ne edustavat erilaisia vasteita silmävaaroihin perustuen tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (TG 405) (17) ja YK:n GHS-luokitusjärjestelmää (*eli* luokkia 1, 2A, 2B tai ei luokiteltu) (4). Muita valintaperusteita olivat kemikaalien kaupallinen saatavuus, korkealaatuisten *in vivo* -tutkimustulosten saatavuus ja BCOP-testimenetelmällä saatujen korkealaatuisten *in vitro* -tulosten saatavuus. Tutkimustulokset ovat nähtävissä asiakirjoista Streamlined Summary Document (3) ja in the ICCVAM Background Review Document for the BCOP test method (2) (18).

Taulukko 1

Teknisen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut suositellut kemikaalit BCOP-testimenetelmälle

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus (2)	BCOP-luokitus
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Luokka 1
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Luokka 1	Luokka 1
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Luokka 2B	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2 (3)	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
EDTA, dikaliumsuola	25102-12-9	Amiinit, karboksyylihappo (suola)	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
Tween 20	9005-64-5	Esteri, polyeetteri	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus (2)	BCOP-luokitus
2-merkaptopyrimidiini	1450-85-7	Asyylihalidi	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
Fenyylibutatsoni	50-33-9	Heterosyklinen	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
Polyoksietyleeni-23-lauryylieetteri (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkoholi	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä in vivo -testillä (OECD TG 405) (17) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (4).

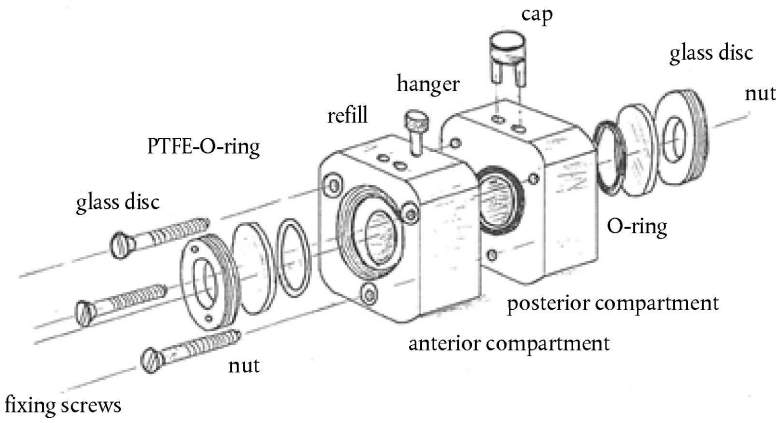
(3) Se, luokitellaanko kemikaali luokkaan 2A vai 2B, riippuu siitää, miten YK:n GHS-järjestelmässä tulkitaan erotettavan nämä kaksi luokkaa, eli onko eläimiä, joilla on seitsemäntenä päivänä vaikutuksia, oltava yksi kolmesta vai kaksi kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. In vivo -tutkimukseen sisältyi kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätepisteet palautuivat nolla-arvoon viimeistään päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä toipumattoman eläimen sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 10.

Lisäys 4

BCOP-TESTISSÄ KÄYTETTY SARVEISKALVOTELINE

BCOP-testissä käytetyt sarveiskalvotelineet valmistetaan reagoimattomasta aineesta (esimerkiksi polypropyleenistä). Telineissä on kaksi puolta (etu- ja takakammio) ja kaksi samanlaista lieriönmuotoista sisäkammiota. Kukin kammio on suunniteltu sellaiseksi, että siihen mahtuu noin 5 ml; kammion päässä on lasi-ikkuna, josta sameusmittaukset kirjataan. Kunkin sisäkammion halkaisija on 1,7 cm ja syvyys 2,2 cm ([1]). Takakammiossa on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Sarveiskalvo asetetaan endoteelipuoli alaspäin takakammion tiivisterenkaan päälle, ja etukammio asetetaan sarveiskalvon epiteelipuolen päälle. Kammiot kiinnitetään paikoilleen kolmella ruostumattomasta teräksestä valmistetulla ruuvilla, jotka sijaitsevat kammion ulkoreunoilla. Kunkin kammion päässä on lasi-ikkuna, joka voidaan poistaa, että sarveiskalvoon päästään helposti käsiksi. Lasi-ikkunan ja kammion välissä on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Medium ja testikemikaalit lisätään kammioon (ja poistetaan siitä) niiden yläosassa olevien kahden aukon kautta. Aukot suljetaan kumitulpilla käsittelyn ja inkubaation ajaksi. Sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrä saattaa muuttua, koska sisäkammioon reikiin tai lasi-ikkunoihin kerääntyvien tai niistä poistuvien kemiallisten jäämien voi vaikuttaa valon sirontaan ja heijastumiseen. Seurauksena voi olla sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrän perustason (ja vastaavasti sameuden perustasolukeman) kasvaminen ja väheneminen, mikä voi ilmetä odotettavien sarveiskalvon sameuden perustason alkumittausten huomattavina muutoksina (eli alussa mitattavat yksittäisissä sarveiskalvotelineissä olevan sarveiskalvojen sameusarvot voivat säännöllisesti poiketa yli kaksi tai kolme sameusyksikköä odotettavista perustasoarvoista). Kunkin laboratorion olisi harkittava tarkastusohjelman laatimista sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon muutosten arvioimiseksi testattavien kemikaalien luonteen ja kammioiden käyttötiheyden mukaan. Perustasoarvojen määrittämiseksi sarveiskalvotelineet voidaan ennen rutiinikäytön aloittamista tarkastaa mittaamalla sameuden perustasoarvot kammioista, jotka on täytetty mediumilla ja joissa ei ole sarveiskalvoja. Sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrä tarkastetaan säännöllisesti käyttöjaksojen aikana. Laboratorio voi määrittää testattavien kemikaalien, käyttötiheyden ja sarveiskalvon sameusarvojen perustasossa tapahtuvien muutosten perusteella itse, miten usein sarveiskalvoteline tarkastetaan. Jos sarveiskalvotelineen läpikulkevan valon määrässä ilmenee huomattavia muutoksia, sarveiskalvotelineen sisäpinta on aiheellista puhdistaa ja/tai kiillottaa tai vaihtaa uuteen.

Sarveiskalvoteline: räjäytyskuva



([1]) Mitat ovat sarveiskalvotelineelle, jota käytetään 12–60 kuukauden ikäisille lehmille. Jos käytetään 6–12 kuukauden ikäisiä eläimiä, olisi teline suunniteltava niin, että kunkin kammion tilavuus on 4 ml ja kunkin sisäkammion halkaisija 1,5 cm ja syvyys 2,2 cm. Jos tehdään uusi, erilainen sarveiskalvoteline, on tärkeää huolehtia siitä, että altistetun sarveiskalvon pinta-alan suhde takakammion tilavuuteen on sama kuin käytettäessä tavanomaista sarveiskalvotelinettä. Tämä on välttämätöntä, jotta läpäisevyysarvot voidaan määrittää oikein IVIS-arvon laskemiseksi ehdotetulla kaavalla.

Lisäys 5

OPASITOMETRI

Opasitometri on laite, jolla mitataan valon läpikulkua. Esimerkiksi BCOP-testimenetelmän validoinnissa käytettävän Electro Designin (Riom, Ranska) OP-KIT-laitteen halogeenilampusta lähetetään valoa kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo. Sameusyksiköt määritetään. Muun tyyppisiä ja rakenteisia opasitometrejä (esimerkiksi sellaisia, joissa ei tarvitse mitata samanaikaisesti kontrolliosastoa ja näytteelle käytettyä osastoa) voidaan käyttää, jos ne antavat validoiduille laitteille todistetusti samanlaisia tuloksia.

Opasitometrillä pitäisi saada lineaarinen vaste sellaisella sameuslukema-alueella, joka kattaa ennustemallissa kuvatuille eri luokituksille käytetyt raja-arvot (ts. siihen arvoon saakka, joka määrittää syövyttävyyden ja/tai vakavan ärsyttävyyden). Jotta voidaan varmistaa, että lukemat ovat lineaarisia ja tarkkoja 75–80 sameusyksikköön saakka, on opasitometri kalibroitava sarjalla kalibraattoreita. Kalibraattorit asetetaan kalibrointikammioon (sarveiskalvokammion, joka on tarkoitettu kalibraattoreiden pitämiseen), ja ne luetaan opasitometrillä. Kalibrointikammio on suunniteltu sellaiseksi, että kalibraattorit ovat siinä suunnilleen samalla etäisyydellä valosta ja valokennosta kuin mihin sarveiskalvot asetettaisiin sameusmittausten ajaksi. Vertailuarvot ja alkuvaiheen asetuspisteet riippuvat käytettävästä laitteesta. Sameusmittausten lineaarisuus olisi vahvistettava soveltuvin (välinekohtaisin) menettelyin. Esimerkiksi Electro Designin (Riom, Ranska) OP-KIT-laitteessa opasitometri kalibroidaan ensin arvoon 0 sameusyksikköä käyttämällä kalibrointikammiota ilman kalibraattoria. Kalibrointikammioon asetetaan sitten peräkkäin kolme erilaista kalibraattoria ja mitataan sameudet. Kalibraattoreilla 1, 2 ja 3 pitäisi saada 5 prosentin tarkkuudella samat sameuslukemat kuin asetetut arvot 75, 150 ja 225 sameusyksikköä."

13) Korvataan B osassa oleva B.48 luku seuraavasti:

"B.48 **Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä, jolla tunnistetaan i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 438 (2013). Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä (Isolated Chicken Eye, ICE) arvioitiin ICCVAMissa (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea) yhdessä Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen (ECVAM) ja Japanin vastaavan keskuksen (JaCVAM) kanssa vuosina 2006 ja 2010 (1) (2) (3). Ensimmäisessä arvioinnissa ICE-menetelmä vahvistettiin tieteellisesti päteväksi testimenetelmäksi, jota voidaan käyttää seulontatestinä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamiseksi, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (luokka 1), kuten Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) (2) (4) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) on määritelty ([1]). Toisessa arvioinnissa käsiteltiin ICE-menetelmän käyttöä seulontatestinä sellaisten kemikaalien tunnistamiseksi, joita ei ole YK:n GHS-järjestelmän (3) (4) nojalla luokiteltu silmä-ärsytystä tai vakavia silmävaurioita aiheuttaviksi. Validointitutkimuksen tulosten ja vertaisarviointilautakunnan suositusten perusteella pitäydyttiin alkuperäisessä suosituksessa, jonka mukaan ICE-menetelmää käytetään vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien luokittelemiseen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1), koska käytettävissä olevaa tietokantaa ei ole muutettu ICCVAMin alkuperäisen validoinnin jälkeen. Siinä vaiheessa ei annettu muita suosituksia

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

ICE-menetelmän soveltamisalan laajentamiseksi myös muihin kategorioihin. Validointitutkimuksessa käytettyjen *in vitro*- ja *in vivo* -tulosjoukkojen uudelleenarvioinnissa keskityttiin arvioimaan ICE-menetelmän käytettävyyttä sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (5). Uudelleenarvioinnin tuloksena oli, että ICE-menetelmää voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmässä määritettyjen silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (4) (5). Testimenetelmä sisältää ICE-menetelmän käyttösuositukset ja -rajoitukset, jotka perustuvat näihin arviointeihin. OECD:n testiohjeen alkuperäisen vuoden 2009 version ja päivitetyn vuoden 2013 version väliset suurimmat erot ovat muun muassa ICE-menetelmän käyttö sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti, testiselosteen osien päivitys, lisäyksen 1 määritelmien päivitys ja lisäyksen 2 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien päivitys.

On yleisesti tunnustettu, että lähitulevaisuudessa millään yksittäisellä silmä-ärsytystä mittaavalla *in vitro* -testillä tuskin voidaan korvata Draizen *in vivo* -silmätestiä, jolla pystytään ennustamaan kaikenlainen ärsytys, jota eri luokkiin kuuluvat kemikaalit voivat aiheuttaa. Draizen silmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata yhdistelemällä strategisesti useita vaihtoehtoisia testimenetelmiä niin, että niistä muodostuu (vaiheittainen) testausstrategia (6). Jäsentävää lähestymistapaa (7) on tarkoitus käyttää silloin, kun kemikaalin odotetaan käytettävissä olevien tietojen perusteella olevan erittäin ärsyttävä, kun taas kokoavaa lähestymistapaa (7) käytetään silloin, kun kemikaalin odotetaan käytettävissä olevien tietojen perusteella aiheuttavan niin vähän silmä-ärsytystä, että sitä ei tarvitse luokitella. ICE-menetelmä on *in vitro* -testi, jota voidaan käyttää 8–10 kohdan mukaisesti tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien luokittelemiseksi ja merkitsemiseksi silmiin kohdistuvien vaarojen osalta. Vaikka ICE-menetelmän ei katsota sellaisenaan korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sitä suositellaan käytettävän ensimmäisenä testinä Scottin ja muiden (7) suositteleman jäsentävän lähestymistavan kaltaisissa testausstrategioissa tunnistamaan vakavia silmävaurioita aiheuttavia kemikaaleja. Nämä kemikaalit luokitellaan ilman lisätestausta YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 (4). ICE-menetelmää suositellaan käytettävän myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta YK:n GHS-järjestelmässä (ei luokitusta) (4), ja siksi sitä voidaan käyttää ensimmäisenä testinä kokoavaa lähestymistapaa soveltavassa testausstrategiassa (7). Lopullisen luokituksen määrittämiseksi sellaisille kemikaaleille, joiden ei ennusteta aiheuttavan vakavia silmävaurioita tai joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen / vakavien silmävaurioiden osalta, on kuitenkin suoritettava lisätestejä (*in vitro* ja/tai *in vivo*). Lisäksi toimivaltaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin ICE-menetelmää käytetään kokoavan lähestymistavan testausstrategiassa jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän puitteissa.

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testattavan kemikaalin vaarallisuus silmälle mittaamalla sen kykyä aiheuttaa toksisuutta irrotetussa kanan silmässä. Sarveiskalvoon kohdistuneet toksisuusvaikutukset mitataan i) määrittämällä sameus kvalitatiivisesti, ii) määrittämällä epiteelivaurio kvalitatiivisesti, kun silmään annostellaan fluoreseiiniä (fluoreseiinin retentio), iii) mittaamalla paksuuntuminen (turpoaminen) kvantitatiivisesti ja iv) arvioimalla pinnan makroskooppiset morfologiset vauriot kvalitatiivisesti. Sarveiskalvon sameus, turpoaminen ja vauriot arvioidaan testattavalle kemikaalille altistuksen jälkeen erikseen, minkä jälkeen ne yhdistetään, jotta niistä voidaan johtaa silmä-ärsytysluokitus.

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu OECD:n ohjeasiakirjassa 160 (8) ehdotettuun protokollaan, joka kehitettiin ICCVAMin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (1) (3) (9). Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus ECVAM, Japanin vastaava keskus ja Alankomaiden sovelletun luonnontieteen tutkimuslaitoksen (TNO) toksikologian ja sovelletun farmakologian elämän laatu -osasto. Protokolla perustuu julkaistuista protokollista ja TNO:n nykyisin käyttämästä protokollasta saatuihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14).

Tämän menetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja. Validointitutkimuksen empiirisessä tietokannassa on 152 kemikaalia, joista 72 on aineita ja 80 seoksia (5). Testimenetelmää voidaan soveltaa kiinteisiin aineisiin, nesteisiin, emulsioihin ja geeleihin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa.

ICE-menetelmää voidaan käyttää vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa. Niitä ovat YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 luokiteltavat kemikaalit (4). Kyseisessä käytössä on havaittu, että ICE-menetelmän haittana ovat alkoholien testauksessa saadut useat väärät positiiviset tulokset sekä kiinteiden aineiden ja pinta-aktiivisten aineiden testauksessa saadut useat väärät negatiiviset tulokset (1) (3) (9). Tässä yhteydessä vääristä negatiivisista tuloksista (eli YK:n GHS-järjestelmän luokkaa 1 ei tunnisteta YK:n GHS-järjestelmän luokaksi 1) ei kuitenkaan ole haittaa, koska kaikki negatiivisen tuloksen saaneet testikemikaalit testataan tämän jälkeen vähintään yhdellä muulla yhtä pätevällä *in vitro* -testillä tai viimeisenä vaihtoehtona sääntelyvaatimuksista riippuen kaneilla käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, jossa sovelletaan todistusnäyttöön perustuvaa lähestymistapaa. On syytä panna merkille, että kiinteät aineet voivat johtaa Draizen *in vivo* -silmä-ärsyttävyystestissä vaihteleviin ja äärimmäisiin altistusolosuhteisiin, minkä vuoksi niiden todellisesta ärsyttävyydestä voidaan saada käyttökelvoton ennuste (15). Tutkijat voisivat harkita tämän testimenetelmän käyttöä kaiken tyyppisiin kemikaaleihin, ja positiivisen tuloksen tulisi tällöin katsoa viittaavan vakavaan silmävaurioon, mikä tarkoittaisi YK:n GHS-järjestelmän luokkaa 1 ilman lisätestausta. Alkoholeilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti yliennustuksen vaaran takia.

Vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1) tunnistamiseen käytettäessä ICE-menetelmän yleinen tarkkuus on 86 prosenttia (120/140), väärien positiivisten tulosten osuus on 6 prosenttia (7/113) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 48 prosenttia (13/27) verrattuna YK:n GHS-järjestelmän mukaan luokiteltuihin *in vivo* -kaninsilmätestistä saatuihin tietoihin (4) (5).

ICE-menetelmää voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta (4). Toimivaltaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin ICE-menetelmää käytetään kokoavan lähestymistavan testausstrategiassa jonkin muun luokitusjärjestelmän puitteissa. Tällä menetelmällä voidaan testata kaiken tyyppisiä kemikaaleja. Negatiivisen tuloksen perusteella kemikaali voitaisiin jättää luokittelematta silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitietokannan yhden tuloksen perusteella orgaanisia liuottimia sisältävien eliönestomaalien vaikutus saatetaan kuitenkin aliennustaa (5).

Kun ICE-menetelmää käytetään sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta, sen yleinen tarkkuus on 82 prosenttia (125/152), väärien positiivisten tulosten osuus on 33 prosenttia (26/79) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 1 prosentti (1/73) verrattuna YK:n GHS-järjestelmän mukaan luokiteltuihin *in vivo* -kaninsilmätestistä saatuihin tietoihin (4) (5). Kun tietokannan ulkopuolelle jätetään tiettyihin luokkiin kuuluvat testikemikaalit (eli orgaanisia liuottimia sisältävät eliönestomaalit), ICE-menetelmän tarkkuus on 83 prosenttia (123/149), väärien positiivisten tulosten osuus on 33 prosenttia (26/78) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 prosenttia (0/71) YK:n GHS-järjestelmässä (4) (5).

ICE-menetelmää ei suositella käytettävän sellaisten testikemikaalien tunnistamiseen, jotka tulisi luokitella silmiä ärsyttäviksi (eli YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2 tai 2A), tai testikemikaaleja, jotka tulisi luokitella lievästi silmiä ärsyttäviksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 2B), koska suuri määrä YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 mukaisia kemikaaleja on luokiteltu liian alhaisiin YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2, 2A tai 2B ja YK:n GHS-järjestelmän mukaisia ”ei luokitusta” -kemikaaleja on luokiteltu liian korkeisiin YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2, 2A tai 2B. Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

Kaikissa kanan silmiä käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä ihmis- tai eläinperäisten materiaalien (muun muassa kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä ja menettelyjä. Suositeltavia ovat yleiset laboratorioissa noudatettavat ennaltavarautumiskäytänteet (16).

Vaikka ICE-menetelmässä ei oteta huomioon kaninsilmätestissä arvioituja sidekalvon ja värikalvon vaurioita, siinä käsitellään vaikutuksia sarveiskalvoon, jotka ovat *in vivo* -testeissä suurin luokittelun peruste YK:n GHS-järjestelmästä puhuttaessa. Kaninsilmätutkimusten perusteella on ehdotettu, että vaikka ICE-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, sarveiskalvovaurion alkusyvyyden perusteella voidaan kuitenkin tunnistaa tietyt palautumattomat vaikutukset (17). Erityisesti tarvitaan enemmän tieteellistä tietoa sen ymmärtämiseksi, miten ensimmäisenä syntyviin suuriin vaurioihin liittymättömät palautumattomat vaikutukset syntyvät. ICE-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä toksisuutta.

Tätä testimenetelmää päivitetään aika ajoin sitä mukaa, kun saadaan uusia tietoja. Esimerkiksi histopatologiasta saattaa olla hyötyä, jos sarveiskalvon vauriota on tarpeen luonnehtia tarkemmin. Tämän mahdollisuuden arvioimiseksi käyttäjiä kehotetaan säilyttämään silmät ja ottamaan histopatologisia näytteitä, joita voidaan käyttää tietokannan luomiseen ja päätösperusteiden laatimiseen, jotta menetelmän tarkkuutta voidaan parantaa. OECD on kehittänyt ohjeasiakirjan silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien käytöstä. Ohjeessa kuvataan yksityiskohtaisesti histopatologisten näytteiden ottaminen ja annetaan tiedot siitä, mihin näytteet ja/tai histopatologiset tiedot tulee toimittaa (8).

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä ICE-menetelmän käytössä ennen kuin se toimittaa ICE-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

ICE-menetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa kanan silmän lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro*. Tässä testimenetelmässä testikemikaalin aiheuttama vaurio arvioidaan määrittämällä sarveiskalvon turpoaminen, sameus ja fluoreseiinin retentio. Kaksi jälkimmäistä muuttujaa arvioidaan kvalitatiivisesti, kun taas sarveiskalvon turpoaminen määritetään kvantitatiivisesti. Kukin mittaus joko muunnetaan kvantitatiiviseksi arvoksi, josta lasketaan yleinen ärsyttävyysindeksi, tai sille osoitetaan kvalitatiivinen luokka, jonka perusteella määritetään *in vitro* silmän vaaraluokitus, joko YK:n GHS-järjestelmän luokka 1 tai YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”. Kummankin tuloksen avulla voidaan ennustaa, kuinka todennäköisesti testikemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita *in vivo* tai voidaanko se jättää luokittelematta silmän vaaraluokituksessa (ks. päätösperusteet). Sellaisia kemikaaleja ei voida luokitella lainkaan, joiden mahdollisuutta aiheuttaa vakavia silmävaurioita ei ole ennustettu tai joita ei ole luokiteltu ICE-menetelmässä (ks. 11 kohta).

Kanansilmien alkuperä ja kanojen ikä

Tässä määrityksessä on tavanomaisesti käytetty teurastamossa elintarviketuotantoa varten teurastetuista kanoista saatuja silmiä, jolloin ei ole tarvittu laboratorioeläimiä. Testiin voidaan käyttää vain silmiä, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä.

Parasta kanan ikää ei ole arvioitu kontrolloidussa tutkimuksessa. Testimenetelmässä on yleensä käytetty sen ikäisiä ja painoisia kanoja kuin siipikarjateurastamossa tavanomaisesti teurastetut kevätkananpojat ovat (eli noin seitsemän viikon ikäisiä, paino 1,5–2,5 kg).

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

Päät tulisi irrottaa heti sen jälkeen, kun kanat on tainnutettu, mikä tehdään tavallisesti sähkösokilla, ja kaula on viilletty verenlaskua varten. Laboratorion läheisyydestä tulisi etsiä paikallinen kanojen teurastamo, jotta kanojen päät voidaan kuljettaa teurastamosta laboratorioon riittävän nopeasti. Näin pilaantuminen ja/tai bakteerikontaminaatio voidaan pitää mahdollisimman vähäisinä. Kananpäiden keräämisestä ja silmien poistamisesta silmien tiputuslaitteen (superfuusiolaitteen) kammioon asettamiseen kuluvan ajan tulisi olla mahdollisimman lyhyt (yleensä enintään kaksi tuntia), jotta näytteiden määrittämisen hyväksymisperusteet täyttyvät. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta, tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

Koska silmät dissekoidaan laboratoriossa, koskemattomat päät kuljetetaan teurastamosta ympäristön lämpötilassa (yleensä 18–25 °C) muovilaatikoissa kosteutettuina isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella kostutetuilla liinoilla.

ICE-testissä käytettävien silmien valintaperusteet ja määrä

Hylätyksi tulevat sellaiset silmät, jotka värjäytyvät voimakkaasti fluoreseiinillä (> 0,5) tai joiden sarveiskalvon sameusarvo on suuri (> 0,5) silmämunan poistamisen jälkeen.

Kussakin käsitellyssä ryhmässä ja samanaikaisesti määritettävässä positiivisessa kontrollissa on oltava vähintään kolme silmää. Negatiivisessa kontrolliryhmässä tai liuotinkontrollissa (jos käytetään muuta liuotinta kuin fysiologista keittosuolaliuosta) on oltava vähintään yksi silmä.

Jos kiinteitä aineita testattaessa tulokseksi tulee YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”, suositellaan testin uusimista vielä kolmella silmällä, jotta tulokselle saadaan vahvistus tai se voidaan hylätä.

MENETTELY

Silmien valmistelu

Silmäluomet leikataan huolellisesti pois varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Sarveiskalvon eheys arvioidaan nopeasti lisäämällä tippa 2-prosenttista (w/v) natriumfluoreseiiniä sarveiskalvon pinnalle muutamaksi sekunniksi, minkä jälkeen pinta huuhdotaan fysiologisella keittosuolaliuoksella. Fluoreseiinillä käsiteltyjä silmiä tarkastellaan rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, ettei sarveiskalvo ole vahingoittunut (eli fluoreseiinin retentio ja sarveiskalvon sameusarvo ovat enintään 0,5).

Jos silmä on vahingoittumaton, se dissekoidaan kallosta varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Silmämuna vedetään irti silmäkuopasta pitäen tiukasti vilkkukalvosta kiinni kirurgisilla pihdeillä, ja silmän lihakset leikataan käyrillä, tylppäkärkisillä saksilla. On tärkeää, ettei sarveiskalvoa vahingoiteta liialla paineella (kompressioartefakta).

Kun silmää poistetaan silmäkuopasta, pitäisi osa näköhermoa jättää kiinni ja näkyville. Kun silmä on poistettu silmäkuopasta, se asetetaan imupaperialustalle, ja vilkkukalvo ja muu sidekudos leikataan pois.

Poistettu silmä kiinnitetään ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pitimeen siten, että sarveiskalvo on pystysuorassa. Pidin siirretään tiputuslaitteen kammioon (18). Pidin asetetaan tiputuslaitteeseen niin, että tiputettava fysiologinen keittosuolaliuos kastelee koko sarveiskalvon (3–4 tippaa minuutissa tai 0,1–0,15 ml/min). Tiputuslaitteen kammioiden lämpötila on pidettävä arvossa 32 ± 1,5 °C. Lisäyksessä 3 esitetään kaavio tyypillisestä tiputuslaitteesta ja silmänpitimistä. Niitä voi ostaa tai ne voi rakentaa itse. Laite voidaan mukauttaa yksittäisen laboratorion tarpeisiin (esimerkiksi eri silmämäärille).

Kun silmät on asetettu tiputuslaitteeseen, niitä tarkastellaan jälleen rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, etteivät ne ole vahingoittuneet dissektiossa. Sarveiskalvon huippukohdan paksuus olisi myös mitattava rakovalomikroskooppiin kuuluvalla syvyydenmittauslaitteella. Jos i) fluoreseiinin retentioarvo on yli 0,5, ii) sarveiskalvon sameus on yli 0,5 tai iii) silmissä on muita vahingoittumisen merkkejä, silmät on vaihdettava toisiin. Niistä silmistä, joita ei ole hylätty edellä mainittujen perusteiden perusteella, hylätään sellaiset, joiden sarveiskalvon paksuus poikkeaa yli 10 prosenttia kaikkien silmien keskiarvosta. Käyttäjien on syytä panna merkille, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on eri. Raon leveys olisi asetettava arvoon 0,095 mm.

Kun kaikki silmät on tutkittu ja hyväksytty, silmiä inkuboidaan noin 45–60 min, jotta ne tasapainottuvat testijärjestelmässä ennen annostelua. Tasapainottumisjakson jälkeen sarveiskalvon paksuudelle ja sameudelle otetaan lukema perusarvoa varten (nolla-arvo ajanhetkellä 0). Dissektion yhteydessä määritettyä fluoreseiniarvoa käytetään fluoreseiinin retention perusarvona.

Testikemikaalin annostelu

Välittömästi nolla-arvojen mittausten jälkeen silmä (telineineen) poistetaan tiputuslaitteesta, asetetaan vaakasuoraan, ja testikemikaali annostellaan sarveiskalvolle.

Nestemäiset testikemikaalit testataan tavallisesti laimentamattomina, mutta ne voidaan laimentaa tarvittaessa (esimerkiksi jos se kuuluu tutkimussuunnitelmaan). Testikemikaalit laimennetaan mieluiten fysiologisella keittosuolaliuoksella. Muitakin liuottimia voidaan käyttää valvotuissa olosuhteissa, mutta muiden liuottimien kuin fysiologisen keittosuolaliuoksen käyttökelpoisuus olisi osoitettava.

Nestemäiset testikemikaalit annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää kokonaan ja tasaisesti sarveiskalvon pinnan; tavanomainen tilavuus on 0,03 ml.

Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan jauhettava mahdollisimman hienoksi morttelissa survimella tai vastaavassa jauhamislaitteessa. Jauhe annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää pinnan tasaisesti; tavanomainen määrä on 0,03 g.

Testiaineen (nesteen tai kiinteän aineen) annetaan vaikuttaa 10 sekunnin ajan, minkä jälkeen se huuhdellaan silmästä fysiologisella keittosuolaliuoksella (noin 20 ml) huoneenlämpötilassa. Telineessä oleva silmä asetetaan uudelleen tiputuslaitteeseen pystysuoraan. Tarvittaessa silmää voidaan huuhdella lisää 10 sekunnin vaikutusajan jälkeen sekä myös myöhemmin (esimerkiksi silloin, kun sarveiskalvolla havaitaan testikemikaalin jäänteitä). Yleensä lisähuuhtelussa käytettävän keittosuolaliuoksen määrällä ei ole merkitystä, mutta kemikaalin tarttumista sarveiskalvolle on ehdottomasti tarkkailtava.

Kontrollikemikaalit

Kussakin kokeessa on oltava mukana negatiiviset eli liuotin-/kantaja-ainekontrollit ja positiiviset kontrollit.

Testattaessa 100-prosenttisia nesteitä tai kiinteitä aineita käytetään ICE-testissä negatiivisena kontrollina fysiologista keittosuolaliuosta, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta.

Testattaessa laimennettuja nesteitä testissä käytetään samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmää, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta. Kuten kohdassa 31 mainitaan, liuotinta/kantaja-ainetta saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä kemikaali positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska ICE-määritystä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava vertailukemikaali, joka aiheuttaa tässä testimenetelmässä vakavan vasteen. Vakava ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida. Positiivisesta kontrollista olisi hankittava riittävästi *in vitro* -tuloksia, jotta positiiviselle kontrollille voidaan laskea tilastollisesti määritelty hyväksyttävä alue. Jos tietylle positiiviselle kontrollille ei ole saatavilla riittävästi aiempia ICE-testimenetelmällä saatuja tuloksia, on tietojen saamiseksi mahdollisesti tehtävä lisätutkimuksia.

Nestemäisten testikemikaalien positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi 10-prosenttista etikkahappoa tai 5-prosenttista bentsalkoniumkloridia, ja kiinteiden testikemikaalien positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi natriumhydroksidia tai imidatsolia.

Vertailukemikaalit ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

Käsitellyt sarveiskalvot arvioidaan ennen käsittelyä ja 30, 75, 120, 180 ja 240 minuuttia (± 5 minuuttia) käsittelyn jälkeen tehdyn huuhtelun jälkeen. Näillä ajanhetkillä saadaan riittävä määrä mittauksia neljän tunnin käsittelyn aikana, ja mittauksien välillä on riittävästi aikaa tehdä kaikista silmistä tarvittavat havainnot.

Arvioidut päätepisteet ovat sarveiskalvon sameus, turpoaminen, fluoreseiinin retentio ja morfologiset vaikutukset (esimerkiksi epiteelin pistemäinen syöpyminen tai irtoaminen). Kaikki määritykset (lukuun ottamatta fluoreseiinin retentiota, joka määritetään vain ennen käsittelyä ja 30 minuutin kuluttua testikemikaalin annostelusta) tehdään kullakin mainitulla ajanhetkellä.

On suositeltavaa ottaa valokuvia osoitukseksi sarveiskalvon sameudesta, fluoreseiinin retentiosta, morfologisista muutoksista ja histopatologiasta (jos sellaisia tutkimuksia on tehty).

Kun viimeinen tutkimus on tehty neljän tunnin kohdalla, silmät suositellaan säilytettävän sopivassa kiinnitysaineessa (esimerkiksi neutraalissa puskuroidussa formaliinissa) mahdollisia histopatologisia tutkimuksia varten (lisätietoja on kohdassa 14 ja lähteessä 8).

Sarveiskalvon turpoaminen arvioidaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista, jotka tehdään rakovalomikroskooppiin kuuluvalla optisella paksuudenmittauslaitteella. Turpoaminen ilmoitetaan prosenttilukuna, ja se lasketaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista seuraavalla kaavalla:

$$\left(\frac{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä } t - \textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä} = 0}{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä} = 0}\right) \times 100$$

Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon turpoamisen prosenttikeskiarvo lasketaan kaikille havaintoajanhetkille. Kullekin testikemikaalille annetaan yleinen luokkaa koskeva arvo sarveiskalvon turpoamiselle saadun korkeimman (millä tahansa ajanhetkellä havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (ks. 51 kohta).

Sarveiskalvon sameus lasketaan käyttäen sitä sarveiskalvon kohtaa, joka antaa suurimman sameusarvon (ks. taulukko 1). Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon keskimääräinen sameusarvo lasketaan kaikille havaintoajanhetkille. Kullekin testikemikaalille annetaan yleinen luokkaa koskeva arvo sarveiskalvon sameudelle saadun korkeimman (minä tahansa ajanhetkenä havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (ks. 51 kohta).

Taulukko 1

Sarveiskalvon sameusarvot

Arvo	Havainto
0	Ei sameutta
0,5	Hyvin heikkoa sameutta
1	Hajanaisia sameita alueita; värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä
2	Selvästi erottuva läpinäkyvä alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan peittyneet
3	Vakavaa sarveiskalvon sameutta; värikalvosta ei ole näkyvillä erityisiä yksityiskohtia; silmäterän kokoa voi tuskin erottaa
4	Täysin samea sarveiskalvo; silmäterää ei näy

Fluoreseiinin retentio arvioidaan ainoastaan 30 minuutin ajanhetkelle (ks. taulukko 2). Kaikkien testattujen silmien fluoreseiinin retention keskiarvo lasketaan tämän jälkeen 30 minuutin ajanhetkelle. Sitä käytetään kullekin testikemikaalille annettavaan yleiseen luokka-arvoon (ks. 51 kohta).

Taulukko 2

Fluoreseiinin retention arvot

Arvo	Havainto
0	Ei fluoreseiinin retentiota
0,5	Hyvin vähäistä yksittäisten solujen värjääntymistä
1	Yksittäisiä värjääntyneitä soluja on hajaantuneena sarveiskalvon käsitellylle alueelle
2	Tiiviitä ja tiheitä yksittäisten värjääntyneiden solujen rykelmiä
3	Laajoja sarveiskalvon alueita, joilla esiintyy tiheää fluoreseiinivärjääntymistä

Morfologisia vaikutuksia ovat esimerkiksi sarveiskalvon epiteelisolujen ”pistemäinen syöpyminen”, epiteelin ”irtoaminen”, sarveiskalvon pinnan ”karhentuminen” ja testikemikaalin ”takertuminen” sarveiskalvoon. Näiden löydösten vakavuus voi vaihdella, ja ne voivat esiintyä samanaikaisesti. Näiden löydösten luokittelu riippuu tutkijan tulkinnasta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Sarveiskalvon sameutta, turpoamista ja fluoreseiinin retentiota koskevat tulokset olisi arvioitava erikseen, jotta kullekin päätepisteelle voidaan muodostaa ICE-luokka. Tämän jälkeen kutakin päätepistettä koskevat ICE-luokat yhdistetään ärsytysluokituksen muodostamiseksi kullekin testikemikaalille.

Päätösperusteet

Kun kukin päätepiste on arvioitu, voidaan ICE-luokat osoittaa ennalta määrätyn vaihteluvälin perusteella. Sarveiskalvon turpoaminen (taulukko 3), sameus (taulukko 4) ja fluoreseiinin retentio (taulukko 5) käyttäen neljää ICE-luokkaa tulkitaan alla olevien asteikkojen mukaisesti. On syytä panna merkille, että taulukossa 3 esitettyjä sarveiskalvon turpoamisarvoja voi soveltaa vain, jos paksuus on mitattu rakovalomikroskoopilla (esim. Haag-Streit BP900), jossa on syvyydenmittauslaite nro 1 ja jonka raon leveys on 9½, mikä vastaa 0,095 mm:iä. Käyttäjien on muistettava, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on eri.

Taulukko 3

ICE-luokitusperusteet sarveiskalvon turpoamiselle

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
0–5	I
> 5–12	II

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
> 12–18 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	II
> 12–18 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 18–26	III
> 26–32 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 26–32 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	IV
> 32	IV

(*) Korkein keskiarvo minä tahansa ajankohtana

Taulukko 4

ICE-luokitusperusteet sameudelle

Keskimääräinen suurin sameusarvo (*)	ICE-luokka
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Keskimääräinen suurin arvo minä tahansa ajankohtana (perustuu taulukon 1 sameusarvoihin).

Taulukko 5

ICE-luokitusperusteet keskimääräiselle fluoreseiinin retentiolle

Keskimääräinen fluoreseiinin retentioarvo 30 minuuttia käsittelyn jälkeen (*)	ICE-luokka
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Perustuu taulukon 2 arvoihin.

Testikemikaalin *in vitro* -luokitus arvioidaan lukemalla GHS-luokitus, joka vastaa sarveiskalvon turpoamiselle, sarveiskalvon sameudelle ja fluoreseiinin retentiolle saatujen kategorioiden yhdistelmää taulukossa 6 esitetyllä tavalla.

Taulukko 6

Yhdistetyt *in vitro* -luokitukset

GHS-luokitus	Kolmen päätepisteen yhdistelmät
Ei luokitusta	3 × I 2 × I, 1 × II
Ei voida ennustaa	Muut yhdistelmät
Luokka 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Sarveiskalvon sameus ≥ 3, kun on kulunut 30 minuuttia (vähintään kahdessa silmässä) Sarveiskalvon sameus = 4 millä tahansa mittausajanhetkellä (vähintään kahdessa silmässä) Vakava epiteelin irtoaminen (vähintään yhdessä silmässä)

(*) Harvinaisemmat yhdistelmät.

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

Testi katsotaan hyväksyttäväksi, jos samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten tai liuotin-/kantaja-ainekontrollien antama GHS-luokitus on ”ei luokitusta” ja samanaikaisesti tehtyjen positiivisten kontrollien antama GHS-luokitus on luokkaluokka 1.

Testiseloste

Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos niillä on merkitystä tutkimuksen suorittamisen kannalta:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos tiedossa

— CAS-numero, jos tiedossa

— testi- tai kontrollikemikaalien puhtausaste ja koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen),

— stabiilius, jos tiedossa.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— silmien alkuperä (esimerkiksi laitos, jossa ne on kerätty).

Testiolosuhteet

— kuvaus käytetystä testijärjestelmästä

— käytetty rakovalomikroskooppi (esimerkiksi sen malli) ja käytetyn rakovalomikroskoopin laiteasetukset

— viittaus aiempiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrollituloksiin ja tarvittaessa hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit

— käytäntö, jolla varmistetaan testimenetelmän eheyden (eli tarkkuuden ja luotettavuuden) säilyminen ajan kuluessa (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien säännöllinen testaus).

Silmien kerääminen ja valmistelu

— luovuttajaeläimen ikä ja paino ja, jos saatavilla, muita erityistietoja eläimistä, joilta silmät ovat peräisin (kuten sukupuoli, rotu)

— silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja -kellonaika, aika kananpäiden keräämisestä poistettujen silmien asettamiseen tiputuslaitteen kammioon)

— silmien valmistelu ja kiinnitys, esimerkiksi niiden laatua, silmäkammioiden lämpötilaa ja testissä käytettävien silmien valintaperusteita koskevat tiedot.

Testimenettely

— toistojen lukumäärä

— käytetyt negatiiviset ja positiiviset kontrollit (ja mahdolliset liuotin- ja vertailukontrollit)

— testikemikaalin annostus, annostelu ja altistusaika

— havaintoajanhetket (ennen käsittelyä ja sen jälkeen)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus käytetyistä tutkimuksen hyväksymiskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— taulukkomuodossa sarveiskalvon turpoaminen, sarveiskalvon sameus ja fluoreseiinin retentio kutakin silmää kohti kunakin havaintoajanhetkenä, mukaan lukien kaikkien testattujen silmien keskiarvot kunakin havaintoajanhetkenä

— sarveiskalvon turpoamisen, sarveiskalvon sameuden ja fluoreseiinin retention korkein havaittu keskiarvo (minä tahansa ajanhetkenä) ja vastaava ICE-luokka

— kuvaus mahdollisista muista havaituista vaikutuksista

— johdettu *in vitro* -GHS-luokitus

— tarvittaessa valokuvat silmistä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 10-7553A. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(4) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York ja Geneve, 2011. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Pariisi.

(6) Tässä liitteessä oleva B.5 luku: Akuutti toksisuus: silmän ärsyttävyys/syövyttävyys.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In vitro* 24, s. 1–9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Pariisi.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. ja Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31: s. 69–76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Saatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. ja Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In vitro* 9: s. 871–929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34: s. 291–296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. ja Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35: s. 23–37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in vitro* 20, s. 78–81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. ja Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla osoitteessa http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. ja Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36: s. 106–117.

(18) Burton, A.B.G., M. York ja R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.*- 19, s. 471–480.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet, sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, joihin sisältyy kaikki tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja kaikki menetelmästä peräisin olevat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai koostumukseen (4).

Ei luokiteltu: Aineet, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 2) tai vakavien silmävaurioiden (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1) osalta. Sama kuin "Ei YK:n GHS-luokitusta".

Fluoreseiinin retentio: ICE-testissä tehty subjektiivinen mittaus fluoreseiininatriumin määrästä, jonka epiteelisolut pidättävät sarveiskalvossa, kun se on altistettu testiaineelle. Fluoreseiinin retentioaste viittaa sarveiskalvon epiteelin vaurioon.

Jäsentävä lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (positiivinen tulos) ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Kokoava lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaalia ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella (negatiivinen tulos) ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita; tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Rakovalomikroskooppi: Laite, jolla tarkastellaan silmää suoraan kaksiokulaarisen mikroskoopin suurennoksella luomalla stereoskooppinen, pysty kuva. Laitetta käytetään ICE-testissä kanan silmän etukammion tarkasteluun ja sarveiskalvon paksuuden objektiiviseen mittaukseen mikroskooppiin liitetyn syvyyttä mittaavan laitteen avulla.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota.

Sarveiskalvon turpoaminen: ICE-testissä objektiivisesti mitattu sarveiskalvon pullistumisen voimakkuus, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Turpoaminen ilmaistaan prosenttilukuna ja lasketaan sarveiskalvon paksuuden perustasomittauksista (ennen annostelua) ja paksuuksista, jotka on mitattu säännöllisin väliajoin sen jälkeen, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille ICE-testissä. Sarveiskalvon turpoamisaste viittaa sarveiskalvon vaurioon.

Seos: Kahdesta tai useammasta aineesta koostuva seos tai liuos, jossa aineet eivät reagoi (4).

Silmälle aiheutuvat palautumattomat vaikutukset: ks. ”Vakava silmävaurio” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokka 1”.

Silmälle aiheutuvat palautuvat vaikutukset: ks. ”Silmä-ärsytys” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokka 2”.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vaihdettavissa ”Silmälle aiheutuvien palautuvien vaikutusten” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokan 2” kanssa (4).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää kemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Monivaiheinen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vaihdettavissa ”Silmälle aiheutuvien palautumattomien vaikutusten” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokan 1” kanssa (4).

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Vertailukemikaali: Kemikaali, johon testikemikaalia verrataan. Vertailukemikaalilla on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava ja muuttumaton alkuperä, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testikemikaaliryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”: Aineet, jotka eivät täytä YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) vaatimuksia. Vaihdettavissa määrityksen ”Ei luokiteltu” kanssa.

YK:n GHS-järjestelmän luokka 1: ks. ”Vakava silmävaurio” ja/tai ”Silmälle aiheutuvat palautumattomat vaikutukset”.

YK:n GHS-järjestelmän luokka 2: ks. ”Silmä-ärsytys” ja/tai ”Silmälle aiheutuvat palautuvat vaikutukset”.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (4).

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT ICE-TESTIMENETELMÄÄ VARTEN

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen tulisi osoittaa tekninen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 13 kemikaalin silmän vaaraluokitus. Kemikaalit valittiin edustamaan silmään kohdistuvia vaaroja koskevia erilaisia vasteita, jotka perustuvat *in vivo* -kaninsilmätestiin (TG 405) ja YK:n GHS-järjestelmään (eli YK:n GHS-järjestelmän kategorioihin 1, 2A, 2B tai "Ei luokitusta") (4) (6). Muita valintaperusteita olivat kemikaalien kaupallinen saatavuus, korkealaatuisten *in vivo* -vertailutietojen saatavuus ja korkealaatuiset ICE-menetelmän *in vitro* -tutkimustulokset. Vertailutiedot ovat nähtävissä OECD:n (5) ja ICCVAMin (9) ICE-menetelmää koskevissa tausta-asiakirjoissa.

Taulukko 1

Suositellut kemikaalit ICE-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Luokka 1
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Luokka 1	Luokka 1
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Luokka 2A	Ei voida ennustaa (4)
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2A (5)	Ei voida ennustaa (4)
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Luokka 2B	Ei voida ennustaa (4)
Dimetyylisulfoksidi	67-68-5	Orgaaninen rikkiyhdiste	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta (rajatapaus)

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Metyylisyklopentaani	96-37-7	Hiilivety (syklinen)	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta
Triasetiini	102-76-1	Lipidi	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokitusta

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (4) (6).

(3) Perustuu ICE-testin tuloksiin (ks. taulukko 6).

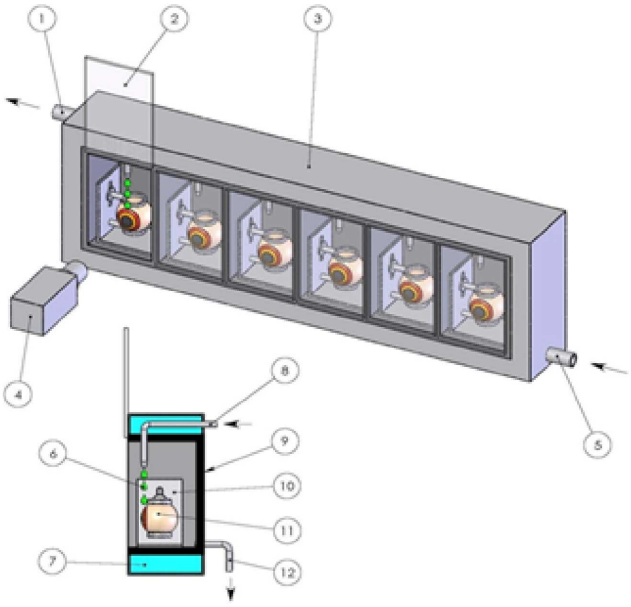
(4) Muiden kuin taulukossa 6 kuvattujen ICE-testitulosten yhdistelmä, josta käy ilmi kuuluvuus YK:n GHS-järjestelmän luokkaan "Ei luokitusta" tai YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 (ks. taulukko 6).

(5) Luokittelu luokkaan 2A tai 2B riippuu siitä, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan, eli siitä, onko päivänä 7 vaikutuksia osoittavia eläimiä oltava yksi vai kaksi kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitellaan luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätepisteet palautuivat nolla-arvoon viimeistään päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä toipumattoman eläimen sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 10.

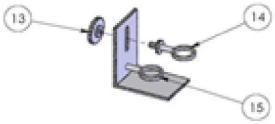
Lisäys 3

ICE-TESTISSÄ KÄYTETYN TIPUTUSLAITTEEN JA SILMÄNPITIMIEN KAAVIOT

(ks. Burton et al. (18), jossa esitetään yleinen kuvaus tiputuslaitteesta ja silmänpitimestä)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nro	Kuvaus	Nro	Kuvaus
1	Lämpimän veden ulostulo	9	Osasto
2	Liukuovi	10	Silmänpidin
3	Tiputuslaite	11	Kanan silmä
4	Optinen mittauslaite	12	Keittosuolaliuoksen ulostulo
5	Lämpimän veden sisäänmeno	13	Säätöruuvi
6	Keittosuolaliuos	14	Säädettävä yläosa
7	Lämmin vesi	15	Kiinteä alaosa”
8	Keittosuolaliuoksen sisäänmeno		

14) Korvataan B osassa oleva B.49 luku seuraavasti:

”B.49 *In vitro* -mikrotumatesti nisäkässoluilla

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 487 (2016).Se on osa genotoksisuutta koskevien testimenetelmien sarjaa. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1)..

In vitro -mikrotumatesti (MNvit) on genotoksisuustesti, jolla määritetään interfaasisolujen sytoplasman mikrotumat. Mikrotumat voivat olla peräisin asentrisista kromosomin osista (joista puuttuu sentromeeri) tai kokonaisista kromosomeista, jotka eivät pysty vetäytymään kohti napoja solunjakautumisen anafaasivaiheessa. Näin ollen MNvit-testi on *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan kattavasti tutkia *in vitro* kromosomivaurioiden mahdollisuutta, koska sillä voidaan havaita sekä aneugeenit että klastogeenit (2) (3) soluissa, joissa on tapahtunut solun jakautuminen testikemikaalille altistumisen aikana tai sen jälkeen (ks. lähemmin 13 kohta). Mikrotumat edustavat vauriota, jotka ovat välittyneet tytärsoluihin. Sen sijaan metafaasivaiheen soluissa esiintyvät kromosomipoikkeavuudet eivät ehkä välity seuraaviin vaiheisiin. Kummassakin tapauksessa muutokset saattavat vaikuttaa solujen elinkykyyn.

Testi voidaan suorittaa niin, että aktiinin polymerisaation inhibiittoria sytokalasiini B:tä (sytoB) käytetään tai ei käytetä. SytoB:n lisääminen ennen tavoiteltua mitoosia johtaa kaksitumaisiin soluihin ja mahdollistaa siten mikrotumien määrittämisen ja analysoinnin ainoastaan niissä soluissa, joissa on tapahtunut yksi mitoosi (4) (5). Tässä testimenetelmässä testisuunnitelmia voidaan soveltaa myös ilman sytokineesin inhibitointia edellyttäen, että analysoitavassa solupopulaatiossa on todistetusti tapahtunut mitoosi.

Mikrotumien muodostumista aiheuttavien kemikaalien tunnistamiseksi toteutettavan MNvit-testin lisäksi kromosomivaurioiden ja mikrotuman muodostumisen mekanismeista voidaan saada tietoa myös käyttämällä kinetokorien immunokemiallista merkkausta tai sentromeeri-/telomeerikoettimilla suoritettavaa hybridisaatiota (fluoresenssi- *in situ* -hybridisaatio (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Näitä merkkaus- ja hybridisaatiomenetelmiä voidaan käyttää, kun mikrotumien muodostuminen on kiihtynyt ja tutkija haluaa määrittää, johtuuko kiihtyminen klastogeenisista ja/tai aneugeenisista tapahtumista.

Koska interfaasisolujen mikrotumat voidaan havaita suhteellisen objektiivisesti, laboratorion henkilökunnan on vain määritettävä kaksitumaisten solujen määrä sytoB:tä käytettäessä ja mikrotumaisten solujen määrä kaikissa tapauksissa. Näin ollen objektilasit voidaan laskea suhteellisen nopeasti ja analysointi voidaan automatisoida. Tämän takia kussakin käsittelyssä voidaan laskea satojen solujen sijaan tuhansia soluja, mikä lisää testin tehokkuutta. Koska mikrotumia voi syntyä hitaasti liikkuvista (”lagging”) kromosomeista, menetelmällä voidaan havaita aneuploidisia tekijöitä, joita on vaikea tutkia perinteisillä kromosomipoikkeavuustesteillä, kuten OECD:n testiohjeella 473 (tässä liitteessä oleva B.10 luku) (18). MNvit-testillä ei kuitenkaan voida eritellä kromosomimäärän ja/tai ploidian muutoksia aiheuttavia kemikaaleja ja klastogeenisia kemikaaleja ilman erityistekniikoita, kuten 4 kohdassa tarkoitettua FISH-tekniikkaa.

MNvit-testi on luotettava ja siinä voidaan käyttää useita eri solutyyppejä joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Erilaisten solutyyppien (solulinjojen viljelmien sekä primääristen soluviljelmien) käytön soveltuvuudesta MNvit-testiin on saatu kattavia todisteita (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Näitä ovat etenkin Société Française de Toxicologie Génétique -järjestön (SFTG) koordinoimat kansainväliset validointitutkimukset (19) (20) (21) (22) (23) sekä genotoksisuuden testausta käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshop on Genotoxicity Testing) selvitykset (5) (17). Saatavilla olevat tiedot on myös arvioitu uudelleen Euroopan komission alaisen Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskuksen (ECVAM) tekemässä todistusnäytön jälkivalidointitutkimuksessa, ja ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) on vahvistanut testimenetelmän tieteellisesti päteväksi (37) (38) (39).

Nisäkässoluilla tehtävässä MNvit-testissä voidaan käyttää ihmisistä tai jyrsijöistä saatujen solulinjojen viljelmiä tai primäärisiä soluviljelmiä. Koska mikrotumien esiintymistaajuus vaikuttaa taustana testin herkkyyteen, testissä olisi käytettävä solutyyppejä, joissa mikrotumien muodostumisen taustataajuus on tasainen ja selvästi erottuva. Käytettävien solujen valintakriteerejä ovat solujen hyvä kasvukyky viljelmässä, niiden karyotyypin pysyvyys (kromosomiluku mukaan luettuna) ja mikrotumien spontaanifrekvenssi (40). Tällä hetkellä käytettävissä olevat tiedot eivät mahdollista vankkoja suosituksia, mutta viittaavat siihen, että kemiallisia vaaroja arvioitaessa on tärkeää ottaa huomioon *p53*-status, geneettinen (karyotyypin) pysyvyys, DNA:n korjautumiskyky sekä testattavaksi valittujen solujen alkuperä (jyrsijät vai ihmiset). Näin ollen tämän testimenetelmän käyttäjiä kehotetaan ottamaan huomioon näiden sekä muiden solujen ominaisuuksien vaikutus solulinjan tehokkuuteen mikrotumien muodostumisen havaitsemisessa tietämyksen lisääntyessä tällä alalla.

Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

In vitro -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisiin testikemikaaleihin. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat väärät positiiviset tulokset eivät heijasta testikemikaalien genotoksisuutta. Tällaisia olosuhteita ovat muun muassa pH-arvon (41) (42) (43) tai osmolaliteetin muutokset, vuorovaikutus soluviljelmän elatusaineen kanssa (44) (45) tai sytotoksisuuden korkea taso (ks. 29 kohta).

Mikrotumien muodostumisen analysoimiseksi on tärkeää, että sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä on tapahtunut mitoosi. Eniten tietoja mikrotumien laskemiseksi saadaan soluista, joissa on tapahtunut yksi mitoosi testikemikaalilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Valmistettuja nanomateriaaleja varten tätä testimenetelmää on mukautettava, mutta mukauttamisia ei kuvailla tästä testimenetelmässä.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

Ihmisistä tai muista nisäkkäistä peräisin olevat soluviljelmät altistetaan testikemikaalille sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metabolointikyky on riittävä (ks. 19 kohta).

Testikemikaalille altistamisen aikana tai sen jälkeen soluja kasvatetaan riittävän kauan, jotta kromosomivauriot tai muut vaikutukset solusykliin/solunjakautumiseen voivat johtaa mikrotuman muodostumiseen inferfaasisoluissa. Jotta aneuploidia muodostuisi, testikemikaalin olisi yleensä oltava läsnä mitoosin aikana. Kerätyt ja värjätyt interfaasisolut analysoidaan mikrotumien havaitsemiseksi. Mikrotumat on laskettava pääasiassa vain niissä soluissa, joissa mitoosi on päättynyt testikemikaalille altistamisen aikana tai käsittelyn jälkeisessä vaiheessa, jos testissä käytetään sitä. Sytokineesin inhibiittorilla käsitellyistä viljelmistä tämä tehdään yksinkertaisesti laskemalla vain kaksitumaiset solut. Jos sytokineesin inhibiittoria ei ole käytetty, on tärkeä osoittaa solupopulaation lisääntymisen perusteella, että analysoiduissa soluissa on todennäköisesti tapahtunut solunjakautuminen testikemikaalille altistumisen aikana tai sen jälkeen. Kaikissa menetelmissä on tärkeä osoittaa, että solut ovat lisääntyneet sekä kontrolliviljelmässä että käsitellyissä viljelmissä, ja testikemikaalin aiheuttamaa sytotoksisuutta tai sytostaasia on arvioitava kaikissa niissä viljelmissä, joiden mikrotumat lasketaan.

MENETELMÄN KUVAUS

Solut

Testeissä voidaan käyttää viljeltyjä ihmisen tai muiden nisäkkäiden perifeerisen veren lymfosyyttejä (7) (20) (46) (47) ja erilaisten jyrsijäsolulinjojen (esimerkiksi CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) tai ihmisen solulinjojen (esimerkiksi TK6) soluja (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ks. 6 kohta). Muiden solulinjojen (esimerkiksi HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2) soluja (52) (53), A549-soluja ja syyrianhamsterialkion primaarisoluja (54) on käytetty mikrotumatestauksessa, mutta toistaiseksi niitä ei ole validoitu laajasti. Tästä syytä näiden solulinjojen ja -tyyppien käyttö on perusteltava esittäen tiedot niiden todistetusta suorituskyvystä testissä Hyväksyttävyysperusteet -kohdan mukaisesti. SytoB:n on raportoitu vaikuttavan mahdollisesti L5178Y-solulinjan solujen kasvuun, ja tästä syystä sitä ei suositella käytettäväksi tämän solulinjan kanssa (23). Primaarisoluja käytettäessä olisi eläinten hyvinvoinnin vuoksi harkittava ihmisestä peräisin olevien solujen käyttöä, kun tämä on mahdollista, edellyttäen, että solut on kerätty ihmisiä koskevien eettisten periaatteiden ja sääntöjen mukaisesti.

Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on kerättävä nuorilta (noin 18–35-vuotiaat), terveiltä, tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille aineille (esimerkiksi kemikaaleille tai ionisoivalle säteilylle) sellaisilla tasoilla, jotka lisäisivät mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyyttä. Näin varmistetaan, että mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyys on matala ja tasainen. Mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyys kasvaa iän myötä, ja ilmiö on yleisempi naisilla kuin miehillä (55). Jos soluja kerätään useammalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien määrä on ilmoitettava. On osoitettava, että solut ovat jakautuneet testikemikaalilla käsittelyn aloittamisen ja solujen keräämisen välillä. Soluviljelmiä pidetään eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa (solulinjat) tai niitä stimuloidaan jakautumaan (primaariset viljelmät tai lymfosyytit), jotta solut altistetaan solusyklin eri vaiheissa, koska soluasteiden herkkyys testikemikaaleille ei ehkä ole tiedossa. Primaarisolut, joita on niiden jakautumiseksi stimuloitava mitogeenisilla aineilla, eivät yleensä ole enää synkronoituja testikemikaalille altistamisen aikana (esimerkiksi ihmisen lymfosyytit 48 tuntia kestävän mitogeenisen stimulaation jälkeen). Synkronoitujen solujen käyttöä testikemikaalilla käsittelyn aikana ei suositella, mutta se voidaan perustelluissa tapauksissa hyväksyä.

Elatusaineet ja viljelyolosuhteet

Soluviljelmiä on viljeltävä sopivissa kasvatusväliaineissa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, kosteutettu ilmakehä, jonka CO_2-pitoisuus on 5 %, 37 °C:n lämpötila). Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei ole mykoplasmakontaminaatiota. Soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä solulinjoissa tai primaarisissa soluviljelmissä on määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen.

Soluviljelmien valmistelu

Solulinjat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään elatusaineeseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioissa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti keräämisajankohtaan asti (esimerkiksi konfluenttisuutta olisi vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään (esimerkiksi 48 tunnin ajan ihmisen lymfosyyttien osalta) mitogeenin (esimerkiksi fytohemagglutiniini, PHA) kanssa solunjakautumisen indusoimiseksi ennen testikemikaalille ja sytoB:lle altistamista.

Metabolinen aktivaatio

Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei jokin muu järjestelmä ole perusteltu, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (56) (57) tai fenobarbitonin ja b-naftoflavonin (58) (59) (60) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen (61) kanssa, ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254:n (58) (59) (60). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiväliaineessa. Mitoosi-indeksiä vähentäviä tuotteita, varsinkin kalsiumkomplekseja aiheuttavia tuotteita (62), olisi vältettävä käsittelyn aikana. Testattavien kemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (63) (64) (65). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

Testiolosuhteet

Liuottimet

Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä tämä haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai soluviljelmän elatusaineen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Hyvin tunnettuja liuottimia ovat vesi ja dimetyylisulfoksidi (DMSO). Yleisesti ottaen orgaanisten liuottimien pitoisuus saa olla enintään 1 tilavuusprosentti. Jos sytoB:tä liuotetaan DMSO:hon, sekä testikemikaalia että sytoB:tä varten käytettävän orgaanisen liuottimen kokonaismäärä saa olla enintään 1 tilavuusprosentti; muussa tapauksessa on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja sen varmistamiseksi, että orgaanisen liuottimen pitoisuudella ei ole haitallisia vaikutuksia. Vesipitoisten liuottimien (suolaliuoksen tai veden) pitoisuus lopullisessa kasvatusväliaineessa saa olla enintään 10 tilavuusprosenttia. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sopivat yhteen ja että ne eivät ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1) sekä liuotinkontrolleja, jotka osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä kromosomeihin kohdistuvia vaikutuksia (esimerkiksi aneuploidia tai klastogeenisyys).

SytoB:n käyttö sytokineesin inhibiittorina

Yhtenä MNvit-testin tärkeimpänä näkökohtana on varmistaa, että lasketuissa soluissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai käsittelyä seuraavalla inkubaatiojaksolla, jos sitä on käytetty. Tästä syystä mikrotumien laskeminen on rajoitettava soluihin, joissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Sytokineesin inhibiittorina käytetään yleisimmin sytoB:tä, koska se estää aktiinin muodostumisen ja näin ollen estää tytärsolujen erkaantumisen mitoosin jälkeen, mikä johtaa kaksitumaisten solujen muodostumiseen (6) (66) (67). Testikemikaalin vaikutus solujen proliferaation kinetiikkaan voidaan mitata samanaikaisesti sytoB:tä käytettäessä. Ihmisen lymfosyyttejä käytettäessä sytokineesin inhibiittorina on käytettävä sytoB:tä, koska solusyklin kesto vaihtelee eri luovuttajien välillä ja koska kaikki lymfosyytit eivät reagoi PHA-stimulaatioon. SytoB:n käyttö ei ole pakollista muita solutyyppejä käytettäessä, jos voidaan osoittaa 27 kohdassa kuvatulla tavalla, että ne ovat jakautuneet. Lisäksi sytoB:tä ei yleensä käytetä, kun näytteitä arvioidaan mikrotumien havaitsemiseksi virtaussytometrisillä menetelmillä.

Laboratorion on määritettävä sopiva sytoB:n pitoisuus erikseen kullekin solutyypille, jotta liuottimella käsiteltyjen kontrolliviljelmien kaksitumaisten solujen määrä voidaan optimoida, ja pitoisuuden on osoitettava tuottavan hyvän kaksitumaisten solujen saannon laskemista varten. Yleensä SytoB:n sopiva pitoisuus on 3–6 µg/ml (19).

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja käsittelypitoisuuksien valitseminen

Päätettäessä testikemikaalin suurimmasta pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 29 kohta), saostumista väliaineeseen (ks. 30 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 9 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä väliaineen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittely-väliaine väärien myönteisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että riittävän monissa käsitellyissä soluissa on tapahtunut mitoosi testin aikana ja että käsittelyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (ks. 29 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solukuoleman ja solukasvun indikaattoreita (ks. 26 ja 27 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä voi olla hyödyksi, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Jos se suoritetaan, se ei saa korvata sytotoksisuuden mittausta pääasiallisessa kokeessa.

Kun viljelmät käsitellään sytoB:llä ja viljelmän yksitumaisten, kaksitumaisten ja monitumaisten solujen suhteellinen osuus määritetään, käsittelyn täsmällinen vaikutus solujen proliferaatioon ja solun sytotoksiseen tai sytostaattiseen toimintaan voidaan määrittää kvantitatiivisesti (6). Lisäksi varmistetaan, että mikroskoopilla tehtävässä laskennassa huomioon otetaan vain solut, jotka ovat jakautuneet käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Sytokineesin eston proliferaatioindeksiä (6) (27) (68) tai replikaatioindeksiä (RI), joka on määritetty vähintään 500 solulle viljelmää kohti, suositellaan käsittelyn sytotoksisen ja sytostaattisen toiminnan arvioimiseksi vertailemalla käsiteltyjen viljelmien ja kontrolliviljelmien arvoja. Myös muiden sytotoksisuuden merkkien (esimerkiksi solujen eheyden, apoptoosin, nekroosin, metafaasien määrän ja solusyklin) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta sitä ei saa käyttää sytokineesin eston proliferaatioindeksin tai RI:n sijasta.

Ilman sytoB:tä tehtävissä tutkimuksissa on osoitettava, että viljelmän solut ovat jakautuneet siten, että merkittävä osuus lasketuista soluista on jakautunut testikemikaalilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Muussa tapauksessa tutkimuksesta voidaan saada vääriä negatiivisia tuloksia. Populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) määrittämistä suositellaan käsittelyn sytotoksisen ja sytostaattisen toiminnan arvioimiseksi (17) (68) (69) (70) (71) (ks. kaavat lisäyksessä 2). Kun näytteenottoajat ovat pitkiä (esimerkiksi käsittely 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan ja kerääminen 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan tämän jälkeen, jolloin näytteenottoajat ovat yhteensä 3–4 normaalia solusykliä, kuten 38 ja 39 kohdassa kuvataan), PSK saattaa johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin (71). Tällaisissa olosuhteissa SLSM saattaa olla parempi mittari, tai sytotoksisuuden arviointi 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan jälkeen antaisi hyödyllisen arvion. Myös muiden sytotoksisuuden tai sytostaattisuuden merkkien (esimerkiksi solujen eheyden, apoptoosin, nekroosin, metafaasien määrän, profileraatioindeksin (PI), solusyklin, tumasiltojen tai mikrotumien) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta sitä ei saa käyttää PSK:n tai SMSL:n sijasta.

Vähintään kolmea hyväksyttävyysperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Solujen tyypistä riippumatta (solulinjat tai primaariset lymfosyyttiviljelmät) kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, vain yhden viljelmän käyttö on myös hyväksyttävää edellyttäen, että yksittäisestä viljelmästä tai rinnakkaisviljelmistä lasketaan sama kokonaismäärä soluja. Yhden viljelmän käyttö on erityisen merkityksellistä, kun arvioidaan useampaa kuin kolmea pitoisuutta (ks. 44–45 kohta). Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset voidaan yhdistää analyysia varten. Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta. sopiva pitoisuuksien välinen kerroin on yleensä 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 29 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja tietojen saamiseksi vähäisestä ja keskitason sytotoksisuustasosta tai annosvastesuhteen tutkimiseksi tarkasti on käytettävä pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja/tai useampaa kuin kolmea pitoisuutta (yksittäisiä viljelmiä tai rinnakkaisviljelmiä) erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 60 kohta).

Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden olisi oltava 55 ± 5 prosenttia suositeltuja sytotoksisuusparametreja käyttäen (solulinjojen SMSL:n ja PSK:n väheneminen, kun sytoB:tä ei käytetä, ja sytokineesin eston proliferaatioindeksin tai RI:n pieneneminen 45 ± 5 prosentin tasoon samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista, kun sytoB:tä käytetään (72). Tulkittaessa vain tämän sytotoksisuuden 55 ± 5 prosentin vaihteluvälin yläpäässä havaittuja positiivisia tuloksia on oltava varovainen (71).

Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalilla käsittelyn päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla havaittavaa sameutta tai saostumista.Vaikka sytotoksisuutta esiintyisi pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suosit eltavaa testata vain yhdessä sameutta tai näkyvää saostumista aiheuttavassa pitoisuudessa, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, että saostuminen ei vaikuta testin suorittamiseen (esimerkiksi värjäykseen tai laskemiseen). Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän elatusaineeseen.

Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (73) (74) (75). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksien reaktiotuote tai biologinen materiaali (UCVB) (76) tai ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (93).

Kontrollit

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava samanaikaisesti näytteet myös negatiivisista kontrolleista (ks. 21 kohta), jotka koostuvat pelkästä tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan, jotta voidaan osoittaa laboratorion kyky tunnistaa klastogeenejä ja aneugeenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus (tarvittaessa). Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa.

Tähän mennessä ei ole havaittu, että yhdenkään aneugeenin genotoksinen toiminta edellyttäisi metabolista aktivaatiota (17). Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit on standardoitu riittävästi samanaikaisesti metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä tehtäviä ja lyhyitä kestoltaan samoja käsittelyjä varten, positiivisten kontrollien käyttö voidaan rajoittaa metabolista aktivaatiota edellyttävään klastogeeniin. Tässä tapauksessa yksikin klastogeeninen positiivinen kontrollisvaste osoittaa sekä metaboolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testijärjestelmän herkkyyden. Pidennetyllä käsittelyllä (ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivaatiota. Jos lyhyen metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä suoritettavan käsittelyn ainoaksi positiiviseksi kontrolliksi valitaan klastogeeni, pidennetyn ilman metabolista aktivaatiota suoritettavan käsittelyn kontrolliksi on valittava aneugeeni. Sekä klastogeenisuuden että aneugeenisuuden positiivisia kontrollikemikaaleja on käytettävä metabolialtaan soveltuvissa soluissa, joissa ei tarvita S9-jaetta

Kutakin positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna, mikä osoittaa koejärjestelmän herkkyyden (vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä), eikä tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso saa vaarantaa vasteen luotettavuutta.

Taulukko 1

Laboratorion pätevyyden arviointia ja positiivisten kontrollien valintaa varten suositellut vertailukemikaalit

Luokka	Kemikaali	CAS-nro
1. **Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota**		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
	Sytosiiniarabinosidi	147-94-4
2. **Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota**		
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi	50-18-0

Luokka	Kemikaali	CAS-nro
3. **Aneugeenit**		
	Kolkisiini	64-86-8
	Vinblastiini	143-67-9

MENETTELY

Altistusohjelma

Jotta aneugeenin tai klastogeenin toiminta tietyssä solusyklin vaiheessa voidaan mahdollisimman todennäköisesti osoittaa, on tärkeää, että testikemikaalilla käsitellään riittävä määrä soluja niiden kaikissa solusyklin vaiheissa. Kaikki käsittelyt on käynnistettävä ja saatava päätökseen, kun solut kasvavat eksponentiaalisesti, ja solujen on jatkettava kasvuaan näytteenottoajankohtaan asti. Solulinjojen ja primääristen soluviljelmien käsittelyaikataulu voi näin ollen poiketa jonkin verran lymfosyyttien käsittelyaikataulusta, sillä niiden solusyklin käynnistyminen edellyttää mitogeenista stimulaatiota (17). Tehokkain menetelmä lymfosyyteille on aloittaa testikemikaalille altistaminen 44–48 tunnin kuluttua PHA-stimulaatiosta, kun solut jakautuvat asynkronisesti (6).

Julkaistujen tietojen perusteella (19) useimmat aneugeenit ja klastogeenit voidaan osoittaa S9-jakeen kanssa ja ilman S9-jaetta toteutettavalla 3–6 tuntia kestävällä lyhyellä käsittelyjaksolla, jonka jälkeen testikemikaali poistetaan ja solut kerätään noin 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen (7).

Negatiivisen tuloksen vahvistamiseksi tarvittavaa perusteellista arviointia varten testi on kuitenkin suoritettava kaikissa seuraavissa kolmessa testiolosuhteissa, joissa käytetään lyhytkestoista käsittelyä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa sekä ilman metabolista aktivaatiota (ks. 56, 57 ja 58 kohta)

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle ilman metabolista aktivaatiota 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (19).

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (19).

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle ilman metabolista aktivaatiota näytteenottoon asti, joka tehdään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua.

Jos joissakin edellä esitetyistä testiolosuhteista saadaan positiivinen vaste, muita altistusohjelmia ei ole välttämättä tarpeen tutkia.

Jos tiedetään tai oletetaan, että testikemikaali vaikuttaa solusyklin kestoon (esimerkiksi kun testataan nukleosidianalogeja) erityisesti testattaessa p53-proteiinia vastaanottamaan kompetentteja soluja (35) (36) (77), näytteenotto- tai palautumisaikoja voidaan pidentää vielä 1,5–2,0 normaalia solusykliä vastaavalla ajalla (eli yhteensä 3,0–4,0 solusyklin mittaisiksi lyhyt- ja pitkäkestoisen käsittelyn aloittamisesta). Näin voidaan ottaa huomioon testikemikaalin ja sytoB:n mahdollinen vuorovaikutus. Kun käytetään pidennettyjä näytteenottoaikoja (yhteensä 3,0–4,0 solusyklin mittaisia viljelyaikoja), on huolehdittava siitä, että solut jakautuvat yhä aktiivisesti. Esimerkiksi lymfosyyttien eksponentiaalinen kasvu voi hidastua 96 tunnin kuluttua stimulaatiosta, ja yksikerrosviljemistä voi tulla konfluentteja.

Solujen ehdotetut käsittelyaikataulut esitetään taulukossa 2. Näitä yleisiä käsittelyaikatauluja voidaan mukauttaa (tämä on perusteltava) testikemikaalin stabiiliuden tai reaktiivisuuden tai käytettävien solujen erityisten kasvuominaisuuksien mukaisesti.

Taulukko 2

Solujen käsittely- ja keräämisajankohdat MNvit-testissä

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat, jotka on käsitelty sytoB:llä	+ S9 Lyhyt käsittely	Käsitellään 3–6 tuntia S9:n kanssa; poistetaan S9 ja käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen.
	– S9 Lyhyt käsittely	Käsitellään 3–6 tuntia; poistetaan käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen.
	– S9 Pidennetty käsittely	Käsitellään 1,5–2 normaalin solusyklin ajan sytoB:n kanssa; kerätään käsittelyjakson päättyessä.
Solulinjat, joita ei ole käsitelty sytoB:n kanssa (Samat käsittelyaikataulut, mutta sytoB:tä ei lisätä)		

Yksikerrosviljelmissä voi esiintyä mitoosissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävän käsittelyn päättyessä. Koska mitoosissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä testikemikaalia sisältävän väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Jos mitoosissa olevien solujen määrän havaitaan lisääntyvän huomattavasti kontrolleihin verrattuna, mikä viittaa todennäköisesti mitoosin pysähtymiseen, solut on kerättävä sentrifugoimalla ja palautettava viljelmään, jotta mitoosivaiheessa olevia soluja, joissa mikrotumia/kromosomipoikkeavuuksia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

Solujen kerääminen ja objektilasien preparointi

Jokainen viljelmä kerätään ja käsitellään erikseen. Solujen preparointiin voidaan käyttää hypotonista käsittelyä, mutta tämä vaihe ei ole tarpeen, jos solut levittäytyvät lasille riittävästi. Objektilasien preparoinnissa voidaan käyttää erilaisia tekniikoita edellyttäen, että pisteytystä varten saadaan korkealaatuisia solupreparaatteja. Solut, joiden solukalvo ja solulima ovat vahingoittumattomia, on säilytettävä mikrotumien osoittamista ja (sytokineesin estämiseen perustuvassa menetelmässä) kaksitumaisten solujen luotettavaa tunnistamista varten.

Objektilasit voidaan värjätä erilaisilla menetelmillä, kuten Giemsa-menetelmällä tai fluorisoivilla DNA-spesifisillä väriaineilla. Asianmukaisten fluorisoivien väriaineiden (esimerkiksi akridiinioranssin (78) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (79)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Mikrotumien sisällön selvittämisessä (kokonaiset kromosomit värjäytyvät, mutta asentriset kromosomifragmentit eivät) voidaan käyttää anti-kinetokorivasta-aineita, FISH-tekniikkaa yhdessä pansentromeeri-DNA-koettimien kanssa tai *in situ* -merkkausta pansentromeerispesifisillä alukkeilla yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen kanssa, jos mikrotumien muodostumisesta halutaan saada mekanistista tietoa (16) (17). Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi ja validoitu. Esimerkiksi tietyissä solulinjoissa sellaisten tumien määrittäminen, joiden kromosomimäärä on alle 2N, hypodiploidisina tapahtumina kuva-analyysin, laserpyyhkäisysytometrian tai virtaussytometrian kaltaisten menetelmien avulla voi myös antaa hyödyllistä tietoa (80) (81) (82). Myös morfologiset havainnot tumista voivat antaa viitteitä mahdollisesta aneuploidiasta. Lisäksi metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuustesti, joka suoritetaan mieluiten samalla solutyypillä ja herkkyydeltään vastaavalla testisuunnitelmalla, saattaa myös olla hyödyllinen tapa määrittää, johtuvatko mikrotumat kromosomien katkeamisesta (kun tiedetään, että kromosomien häviämää ei havaittaisi kromosomipoikkeavuustestissä).

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös negatiivisia ja käsittelemättömiä kontrolleja (jos niitä käytetään) ja positiivisia kontrolleja sisältävät, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikrotumien esiintymistaajuuden mikroskooppitutkimusta. Käytettäessä automatisoitua pisteytysjärjestelmää, kuten virtaussytometriaa, laserpyyhkäisysytometriaa tai kuva-analyysia, on käytettävä tarvittavia menetelmiä mahdollisten virheiden tai muutosten valvomiseksi. Riippumatta siitä, käytetäänkö mikrotumien laskentaan automaattista järjestelmää, olisi arvioitava samanaikaisesti sytokineesin eston proliferaatioindeksi, RI, PSK tai SMSL.

SytoB-käsiteltyjen viljelmien mikrotumien määrä on analysoitava vähintään 2 000 kaksitumaisessa solussa kutakin pitoisuutta ja kontrollia kohti (83). Solujen on jakauduttava tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää (ks. 28 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti (83). Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 kaksitumaista solua (jos käytetään rinnakkaisviljelmiä) tai 2 000 solua (jos käytetään yhtä viljelmää) viljelmää kohti ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähemmän sytotoksisilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin. On varmistettava, että muodoltaan epäsäännöllisiä kaksitumaisia soluja tai soluja, joiden kaksi tumaa poikkeavat kooltaan huomattavasti toisistaan, ei lasketa. Kaksitumaisia soluja ei myöskään saa sekoittaa huonosti levittyneisiin monitumaisiin soluihin. Useampia kuin kaksi päätumaa sisältävistä soluista ei pitäisi analysoida mikrotumia, koska mikrotumien määrä voi olla tällaisissa soluissa suurempi (84). Yksitumaisten solujen laskeminen hyväksytään, jos testikemikaalin on osoitettu häiritsevän sytoB:n aktiivisuutta. Testin toistaminen ilman sytoB:tä saattaa olla tällaisissa tapauksissa hyödyllistä. Yksitumaisten solujen laskeminen kaksitumaisten solujen lisäksi saattaa antaa hyödyllistä tietoa (85) (86), mutta se ei ole pakollista.

Solulinjoissa, jotka testataan ilman sytoB-käsittelyä, mikrotumat olisi pisteytettävä vähintään 2 000 solussa testattavaa pitoisuutta ja kontrollia kohti (83). Solujen on jakauduttava tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää pitoisuutta kohti (ks. 28 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti. Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 solua (jos käytetään rinnakkaisviljelmiä) tai 2 000 solua (jos käytetään yhtä viljelmää) viljelmää kohti ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähemmän sytotoksisilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin.

Kun sytoB:tä käytetään, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä solujen proliferaation arvioimiseksi (ks. lisäys 2) käyttämällä vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Kun käsittely tehdään ilman sytoB:tä, on tärkeää esittää todisteet siitä, että laskettavat solut ovat jakautuneet (ks. 24–28 kohta).

Laboratorion pätevyys

Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailukemikaaleilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja yksi ilman sitä sekä yksi aneugeenisen mekanismin välityksellä vaikuttava kemikaali, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista kemikaaleista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (joihin sisältyy käsittelemättömiä viljelmiä ja erilaisia liuottimia/kantaja-aineita). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta eli joista on käytettävissä 49–52 kohdassa määritelty laboratorio-kohtainen tietokanta.

Tiettyjä positiivisia kontrollikemikaaleja (ks. taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pidennetyillä käsittelyillä ilman metabolista aktivaatiota ja myös lyhyellä käsittelyllä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa, jotta osoitetaan pätevyys havaita klastogeenisia ja aneugeenisia kemikaalisia, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa laskentamenetelmien (mikroskooppianalyysi, virtaussytometria, laserpyyhkäisysytometria tai kuva-analyysi) soveltuvuus. Valittujen kemikaalien eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa aluksi tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten samanaikaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen negatiivisten kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun kontrollien jakaumaan lisätään kokeellisia tietoja, samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (87) (88). Laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten laadunvalvontakortteja (esimerkiksi C-kortteja tai X-bar-kortteja (88)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseeen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (83). Lisäsuosituksia aiempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aiempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (87).

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa olisi otettava huomioon tietojen yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aiempia kontrolleja koskevien tietokantojen kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta.

Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mikrotumaisten solujen esiintymistiheydestä yhdessä viljelmässä tai niiden yhteismäärästä rinnakkaisviljelmissä 28 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (87) (88). Jos samanaikaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aiempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 50 kohta), sekä siitä, että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

Jos käytetään sytokineesin inhibiittoritekniikkaa, mikrotumien indusoitumisen arvioinnissa käytetään vain sellaisia kaksitumaisia soluja, joissa esiintyy mikrotumia (riippumatta mikrotumien määrästä solua kohti). Yksi, kaksi tai monta mikrotumaa omaavien solujen määrä voidaan ilmoittaa erikseen, ja sen laskemisella voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta se ei ole pakollista.

Kaikille käsitellyille, negatiivisille ja positiivisille kontrolliviljelmille olisi tehtävä samanaikaisesti sytotoksisuus- ja/tai sytostaasimääritykset (16). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on laskettava kaikille käsitellyille viljelmille ja kontrolliviljelmille määrittämällä solusyklin viivästyminen, kun käytetään sytokineesin estomenetelmää. Jos sytoB:tä ei käytetä, on määritettävä populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen tai solumäärän suhteellisen lisääntyminen (ks. lisäys 2).

Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyysperusteet ovat seuraavat:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan hyväksyttäväksi laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 50 kohdan mukaisesti.

— Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 50 kohta) on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia laboratorion aiempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa, ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

— Solujen proliferaatiota koskevien kriteereiden on täytyttävä liuotinkontrollissa (25–27 kohta).

— Testi suoritettiin kaikissa testiolosuhteissa, ellei jokin niistä tuottanut positiivisia tuloksia (36–40 kohta).

— Riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (28 sekä 44–46 kohta).

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 24–31 kohdassa esitettyjä kriteerejä.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Edellyttäen, että kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista (ks. 36–39 kohta)

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkittävän lisääntymisen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin (89)

— lisääntyminen on annoksesta riippuva ainakin yhdessä testiolosuhteista asianmukaisella trenditestillä arvioituna (ks. 28 kohta)

— jokin tuloksista on aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; katso 52 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan indusoida kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on myös suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (90) (91) (92).

Edellyttäen, että kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista (ks. 36–39 kohta):

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuudesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

— kaikki tulokset ovat aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; katso 52 kohta).

Tällöin katsotaan, että testikemikaali ei voi indusoida kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on myös suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (90) (91) (92).

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatun mukaisesti ja/tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja on arvioitava asiantuntija-arvion ja/tai lisätutkimusten avulla. Lisäsolujen laskeminen (tarvittaessa) tai kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

Joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei lisätutkimusten jälkeenkään voida tehdä varmoja päätelmiä positiivisuudesta tai negatiivisuudesta, ja tulokset jäävät näin ollen epäselviksi.

MNvit-testissä testikemikaalit voivat aiheuttaa mikrotumien muodostumista indusoimalla kromosomien katkeamista, niiden häviämistä tai molempia. Antikinetokorivasta-aineilla, sentromeerispesifisillä *in situ* -koettimilla tai muilla menetelmillä voidaan yrittää määrittää, johtuuko mikrotumien indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta.

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalien reagointi liuottimen/kantaja-aineen tai solujen kasvatusväliaineen kanssa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän elatusaineessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuvat aineet:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusväliaineessa

Solut:

— käytettyjen solujen tyyppi ja alkuperä

— käytetyn solutyypin soveltuvuus

— solulinjojen osalta mykoplasman puuttuminen

— solulinjojen osalta tiedot solusyklin kestosta tai proliferaatioindeksi

— lymfosyyttien osalta verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja muut merkitykselliset tiedot luovuttajista, tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosyyttejä, käytetty mitogeeni

— tavallinen (negatiivisen kontrollin) solusyklin kesto

— solulinjojen osalta siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla

— solulinjojen osalta soluviljelymenetelmät

— solulinjojen osalta kromosomien modaalinen lukumäärä

Testiolosuhteet:

— mahdollinen sytokineesin inhibiittori (esimerkiksi sytoB), sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusväliaineessa (esimerkiksi µg tai mg/mL tai mM kasvatusväliaineessa)

— pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— väliaineen koostumus ja tarvittaessa CO_2-pitoisuus, kosteuspitoisuus

— kasvatusväliaineeseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubaatiolämpötila ja -aika

— käsittelyn kesto

— käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta

— tarvittaessa solutiheys inokuloitaessa

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa kasvatusväliaineessa, S9-jakeen laadunvalvonta [esimerkiksi entsymaattinen aktiivisuus, steriiliys, metabolointikyky])

— positiiviset ja negatiiviset kontrollikemikaalit, lopulliset pitoisuudet, käsittelyolosuhteet ja käsittelyjen kestot sekä palautumisajat

— objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat

— mikrotumaisten solujen laskentaperusteet (analysoitavissa olevien solujen valinta ja mikrotumien tunnistus)

— analysoitujen solujen määrät

— sytotoksisuuden mittausmenetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— käytetyt tilastoanalyysimenetelmät

— tarvittaessa menetelmät sen määrittämiseksi, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja vai kromosomifragmentteja, esimerkiksi kinetokorivasta-aineen tai pansentromeerispesifisten koettimien käyttö

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— analysoitavaksi hyväksyttävien solujen määritelmä

— jos sytoB:tä ei käytetä, käsiteltyjen solujen lukumäärä ja solulinjojen osalta kustakin viljelmästä kerättyjen solujen lukumäärä

— käytetyt sytotoksisuuden määritysmenetelmät, esimerkiksi sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI (sytokineesin estoon perustuva menetelmä); solumäärän suhteellinen lisääntyminen tai populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (muu kuin sytokineesin estoon perustuva menetelmä); tarvittaessa muut havainnot (esimerkiksi solujen konfluenssi, apoptoosi, nekroosi, metafaasien määrä ja kaksitumaisten solujen määrä)

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— tiedot käsittelyväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty

— yksi-, kaksi- ja monitumaisten solujen osuudet, jos sytokineesin estoon perustuvaa menetelmää on käytetty

— mikrotumaisten solujen määrä kussakin käsitellyssä viljelmässä ja kontrolliviljelmässä ja tiedot solujen mahdollisesta kaksitumaisuudesta tai monitumaisuudesta

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aiemmat tiedot negatiivisista (liuotin) ja positiivisista kontrolleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä jakauman 95 prosentin kontrollirajat sekä tietojen lukumäärä

— tilastoanalyysi; mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris..

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 1–4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, s. 3–15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, s. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 35/3, s. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, s. 1084–1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, s. 193–198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, s. 34–43.

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, s. 9–20.

(10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, s. 297–302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, s. 329–334.

(12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, s. 205–213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, s. 519–525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, s. 9–20.

(15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, s. 233–245.

(16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, s. 211–219.

(17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, s. 153–163.

(18) Tässä liitteessä oleva B.10 luku: *Kromosomipoikkeavuustesti nisäkässoluilla in vitro.*

(19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 13–36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 37–60.

(21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 61–87.

(22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 88–124.

(23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 125–152.

(24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 187–208.

(25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 45–59.

(26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, s. 81–116.

(27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, s. 183–190.

(28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, s. 55–71.

(29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research,* Vol. 468/2, s. 137–163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, s. 123–134.

(31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, s. 569–580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 1–152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research,* Vol. 702/2, s. 139–147.

(34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* Vol. 59/1, s. 28–36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 52/5, s. 373–384.

(36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, s. 105–115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC:in 25. kokous, 16.–17. marraskuuta 2006. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, s. 271–283.

(40) ILSI paper (luonnos). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation research*.

(41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, s. 147–205.

(42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, s. 297–305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, s. 789–886.

(44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, s. 177–183.

(45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*., Vol. 49, s. 439–452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, s. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, s. 11–18.

(48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, s. 825–840.

(49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, s. 251–259.

(50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, s. 555–560.

(51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 295–304.

(52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, s. 257–260.

(53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, s. 315–328.

(54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, s. 61–70.

(55) Bonassi, S. *et al.* (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, s. 31–45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, s. 173–215.

(57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, s. 55–65.

(58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, s. 175–177.

(59) Matsushima, T. *et al.* (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", teoksessa *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al.* (toim.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, s. 51–59.

(61) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavilla osoitteessa http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 190/3, s. 225–228.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", teoksessa Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (toim.), Plenum, New York, s. 91–103.

(64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis,* Vol. 5/6, s. 795–801.

(65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research,* Vol. 652/2, s. 122–130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, s. 35–44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, s. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, s. 97–100.

(69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, s. 1–3.

(70) Surralles, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, s. 169–184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 724, s. 86–87.

(72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research,* Vol. 723/2, s. 101–107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Saatavilla pyynnöstä.

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 741, s. 32–56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 54/1, s. 36–43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research,* Vol. 746/1, s. 29–34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, s. 241–247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, s. 269–275.

(80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 52/4, s. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 52/5, s. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis,* Vol. 25/1, s. 33–40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, s. 65–75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis,* Vol. 13/2, s. 193–198.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, s. 873–899.

(87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol.723/2, s. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2. painos., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "*In vitro* micronucleus test", teoksessa *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics,* 2. painos, Chow, S. (toim.), Marcel Dekker, Inc. New York, s. 463–467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. painos, John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

(92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays, teoksessa *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneugeeni: aine tai prosessi, joka on vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosin tai puhkeamisen seurauksena.

Genotoksinen: yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymiselle, geenimutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Interfaasisolut: solut, jotka eivät ole mitoosivaiheessa.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Kinetokori: proteiinia sisältävä rakenne, joka rakentuu kromosomin sentromeerin kohdalle, johon tumasukkulat kiinnittyvät solun jakautumisen aikana ja jonka ansiosta tytärkromosomit voivat liikkua kohti tytärsolujen napoja.

Klastogeeni: aine tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Käsittelemätön kontrolli: soluviljelmät, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta), mutta jotka käsitellään samanaikaisesti samalla tavoin kuin testikemikaalia saavat soluviljelmät.

Liuotinkontrolli: yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Maksan S9-jae: maksan homogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemättömästä maksasta eristetty osa.

Mikrotumat: pienet tumat, jotka eivät ole solujen varsinaisia tumia vaan esiintyvät niiden lisäksi ja jotka muodostuvat hitaasti liikkuvista kromosomifragmenteista tai kokonaisista kromosomeista mitoosin tai meioosin telofaasin aikana.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Nondisjunktio: häiriö, jossa kromatidiparit eivät erkaannu toisistaan ja jakaudu oikein kehittyviin tytärsoluihin, minkä takia tytärsolujen kromosomimäärä poikkeaa tavallisesta.

p53-status: p53-proteiini osallistuu solusyklin säätelyyn, apoptoosiin ja DNA:n korjautumiseen. Solut, joista puuttuu toimiva p53-proteiini tai jotka eivät pysty pysäyttämään solusykliä tai hävittämään vahingoittuneita soluja apoptoosilla tai muilla p53-proteiinin toimintoihin liittyvillä mekanismeilla (esimerkiksi indusoimalla DNA:n korjautumisen, ovat teoriassa alttiimpia geenimutaatioille tai kromosomipoikkeavuuksille.

Pitoisuudet: testikemikaalin lopulliset pitoisuudet kasvatusväliaineessa.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Proliferaatioindeksi (PI): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Replikaatioindeksi (RI): altistus- ja palautumisjakson aikana päättyneiden solunjakautumissyklien osuus käsitellyssä viljelmässä verrattuna käsittelemättömään kontrolliviljelmään (ks. kaava lisäyksessä 2).

S9-seos: S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Sentromeeri: kromosomin DNA:n alue, jossa kromatidit liittyvät yhteen ja johon molemmat kinetokorit kiinnittyvät rinnakkain.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytokineesi: solun jakautuminen välittömästi mitoosin jälkeen, jolloin muodostuu kaksi yksitumaista tytärsolua.

Sytokineesin eston proliferaatioindeksi (SEPI): toisen jakautumisvaiheen solujen osuus käsitellyssä populaatiossa käsittelemättömään kontrollipopulaatioon verrattuna (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytostaasi: solujen kasvun estäminen (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän kattamien, sytokalasiini B:n läsnäollessa suoritettujen testien osalta sytotoksisuus määritellään käsiteltyjen solujen sytokineesin eston proliferaatioindeksin (SEPI) tai replikaatioindeksin (RI) pienenemiseksi negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 26 kohta ja lisäys 2).

Tämän testimenetelmän kattamien, ilman sytokalasiini B:tä suoritettujen testien osalta sytotoksisuus määritellään käsiteltyjen solujen populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) vähentymiseksi negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 27 kohta ja lisäys 2).

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Kun sytoB:tä käytetään, sytotoksisuuden arvioinnin on perustuttava **sytokineesin eston proliferaatioindeksiin (SEPI)** tai **replikaatioindeksiin (RI)** (17) (69). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi ilmaisee tumien keskimääräistä määrää solua kohti, ja sitä voidaan käyttää solujen proliferaation laskemiseen. RI ilmaisee solusyklien suhteellista määrää solua kohti käsitellyissä viljelmissä sytoB:lle altistamisen aikana verrattuna kontrolliviljelmiin, ja sitä voidaan käyttää sytostaasiasteen (sytostaasi- %) laskemiseen seuraavasti:

$$\text{sytostaasi- \%} = 100 - 100\{(\text{SEPI}_T - 1) \div (\text{SEPI}_C - 1)\}$$

ja:

T = testikemikaalilla käsitelty viljelmä

C = kontrolliviljelmä

jossa

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{ kaksitumaisten solujen määrä}) + (3 \times \text{ monitumaisten solujen määrä}))}{(\text{solujen kokonaismäärä})}$$

Näin ollen, jos SEPI = 1 (kaikki solut ovat yksitumaisia), sytostaasi on 100 %.

Sytostaasi = 100 − RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{ monitumaisten solujen määrä}))/(\text{solujen kokonaismäärä})_T}{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{ monitumaisten solujen määrä}))/(\text{solujen kokonaismäärä})_C} \times 100$$

T = käsitellyt viljelmät

C = kontrolliviljelmät

Näin ollen, jos RI = 53 %, kontrolliviljelmässä kaksitumaisiksi ja monitumaisiksi soluiksi jakaantuneiden solujen määrään verrattuna vain 53 % soluista jakaantui käsitellyssä viljelmässä, eli sytostaasi on 47 %.

Kun sytoB:tä ei käytetä, sytotoksisuus on arvioitava **solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL)** tai **populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK)** perusteella (69), koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{solujen määrän lisääntyminen käsitellyissä viljelmissä(loppu-alku)})}{(\text{solujen määrän lisääntyminen kontrolliviljelmissä(loppu-alku)})} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisen määrä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisen määrä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

jossa

populaation kaksinkertaistuminen = [log (solumäärä käsittelyn jälkeen ÷ alkuperäinen solumäärä)] ÷ log 2

Näin ollen, jos SMSL tai PSK = 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi = 47 %.

Sytotoksisuutta voidaan arvioida **proliferaatioindeksin (PI)** avulla laskemalla 1 solusta (kl1), 2 solusta (kl2), 3 tai 4 solusta (kl4) ja 5–8 solusta (kl8) muodostuneiden kloonien määrä seuraavasti

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

Proliferaatioindeksiä on käytetty sytotoksisuuden tärkeänä ja luotettavana parametrina myös ilman sytoB:tä *in vitro* viljellyille solulinjoille (35) (36) (37) (38), ja sitä voidaan pitää hyödyllisenä lisäparametrina.

Joka tapauksessa solujen määrän ennen käsittelyä olisi oltava sama käsitellyissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä.

Vaikka solumäärän suhteellista lisääntymistä (solujen lukumäärä käsitellyissä viljelmissä / solujen lukumäärä kontrolliviljelmissä) on aiemmin käytetty sytotoksisuuden parametrina, sitä ei enää suositella, koska se voi johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin.

Käytettäessä automaattisia laskentajärjestelmiä, kuten virtaussytometriaa, laserpyyhkäisysytometriaa tai kuva-analyysia, kaavassa käytetty solumäärä voidaan korvata tumien määrällä.

Negatiivisissa kontrolliviljelmissä populaation kaksinkertaistumisen tai replikaatioindeksin määrittämisessä on noudatettava vaatimusta ottaa soluista näyte noin 1,5–2,0 normaalia solusykliä vastaavan ajan kuluttua käsittelyn jälkeen."

15) Lisätään B osaan luvut seuraavasti:

"B.59 *In chemico* -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 442C (2015). Ihoa herkistävällä aineella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. ([1]) Tämä testimenetelmä on *in chemico* -menetelmä (Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA), joka auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista YK:n GHS-järjestelmän sekä CLP-asetuksen mukaisesti.

Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Olemassa olevat tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty tiivistetysti haittavaikutusreitin (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) muodossa herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta välivaiheiden kautta aina haittavaikutukseen eli ihmisen allergiseen kosketusihottumaan tai jyrsijän kosketusallergiaan. Ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin.

Ihon herkistymisen arvioinnissa on käytetty yleensä koe-eläimiä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnusson–Kligmanin GMPT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6 (3)) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Myös hiirillä tehty LLNA-koe (Local Lymph Node Assay, TM B.42 (4)) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta (LLNA: DA (TM B.50 (5)) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testimenetelmät on katsottu tieteellisesti päteviksi menetelmiksi kemikaalien ihoherkistysvaaran arviointiin. Jotta käytössä olevat eläinkokeet voidaan korvata täysin, testausta ja arviointia koskeviin yhdennettyihin lähestymistapoihin (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) tarvitaan kuitenkin eläinkokeettomien menetelmien (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) yhdistelmiä, sillä kullakin nykyisin käytettävissä olevalla eläinkokeettomalla testimenetelmällä voidaan kattaa haittavaikutusreitti mekanistisesti vain rajallisesti (2) (7).

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

DPRA-menetelmällä on tarkoitus tutkia ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä herkistymisen käynnistävää molekyylitason tapahtumaa eli proteiinin reaktiivisuutta kvantifioimalla testikemikaalien reaktiivisuutta suhteessa mallin synteettisiin peptideihin, jotka sisältävät joko lysiiniä tai kysteiiniä (8). Tämän jälkeen kysteiiniä ja lysiiniä sisältävien peptidien depleetioarvojen avulla aine luokitellaan yhteen neljästä reaktiivisuusluokasta, mikä auttaa erottelemaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista (9).

DPRA-menetelmää on arvioitu Euroopan unionin vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien vertailulaboratorion (EURL ECVAM) johtamassa validointitutkimuksessa, minkä jälkeen sen tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) teki riippumattoman vertaisarvioinnin. Menetelmän katsottiin olevan tieteellisesti pätevä (10) käytettäväksi osana testausta ja arviointia koskevaa yhdennettyä lähestymistapaa (IATA) ihoa herkistävien aineiden erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista vaaran luokittelua varten ja merkintätarkoituksiin. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten DPRA-menetelmällä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (11) (12) (13) (14).

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT, KÄYTETTÄVYYS JA RAJOITUKSET

Proteiinin reaktiivisuuden on vahvistettu korreloivan ihon herkistämispotentiaalin kanssa (15) (16) (17). Koska proteiinin sitoutuminen on kuitenkin haittavaikutusreitissä vain yksi keskeinen tapahtuma, joskin ihon herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma, testaamiseen perustuvilla ja muilla menetelmillä hankittu tieto proteiinin reaktiivisuudesta ei välttämättä riitä itsessään osoittamaan, etteivät kemikaalit voi herkistää ihoa. Siksi tällä testimenetelmällä tuotettuja tietoja pitäisi tarkastella yhdennettyjen lähestymistapojen (esimerkiksi IATA) valossa yhdistämällä ne muihin, täydentäviin tietoihin, kuten tietoihin, jotka on saatu *in vitro* -kokeilla, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista.

Tätä testimenetelmää voidaan käyttää yhdessä muiden täydentävien tietojen kanssa ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista IATA:n valossa. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokkiin 1A ja 1B eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntelykehyksestä riippuen DPRA-menetelmällä saatua positiivista tulosta voidaan kuitenkin sellaisenaan käyttää kemikaalin luokitteluun YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

DPRA-testimenetelmän on osoitettu olevan siirrettävissä laboratorioihin, joilla on kokemusta korkean suorituskyvyn nestekromatografisista (HPLC) analyyseista. Testimenetelmällä odotettavasti saatavien ennusteiden toistettavuus on 85 prosentin luokkaa laboratorioissa ja 80 prosentin luokkaa laboratorioiden välillä (10). Validointitutkimuksen (18) ja kaikkiaan julkaistujen tutkimusten (19) tulokset viittaavat siihen, että DPRA:n tarkkuus ihoa herkistävien aineiden erottelussa (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) herkistystä aiheuttamattomista aineista on 80 prosenttia (N = 157), herkkyys 80 prosenttia (88/109) ja spesifisyys 77 prosenttia (37/48) LLNA-kokeen tuloksiin verrattuna. DPRA:lla saadaan todennäköisemmin aliarvioiva ennuste siitä, että kemikaalien ihoherkistyspotentiaali on lievästä kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B) kuin että niiden ihoherkistyspotentiaali olisi suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (18) (19). Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat DPRA-menetelmän käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testimenetelmää pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa ja edellä olevan kohdan 9 mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-koe samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta kiinnostuksen kohteena olevan lajin eli ihmisen tapauksessa. Saatavana olevat kokonaistiedot osoittavat, että DPRA-menetelmällä voidaan testata kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin toiminnallisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (*in vivo* -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia psykokemiallisia ominaisuuksia (8) (9) (10) (19). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että DPRA-menetelmää voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaaran tunnistamisessa.

Tässä testimenetelmässä käytetyllä termillä ”testikemikaali” tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä termi liity siihen, voidaanko DPRA-menetelmää käyttää aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää metalliyhdisteiden testaamiseen, sillä niiden tiedetään reagoivan proteiinien kanssa muilla tavoin kuin muodostamalla kovalenttisidoksia. Testikemikaalin pitäisi liueta sopivaan liuottimeen, niin että lopullisen liuoksen pitoisuus on 100 mM (ks. 18 kohta). Ellei testikemikaali liukene niin, että tällainen pitoisuus olisi saavutettavissa, sitä voidaan kuitenkin testata alhaisemmalla pitoisuudella. Tällöin positiivisen tuloksen perusteella testikemikaali voidaan edelleen määrittää ihoa herkistäväksi aineeksi, mutta negatiivisen tuloksen perusteella ei voida tehdä varmoja päätelmiä reaktiivisuuden puuttumisesta. Siitä, voidaanko DPRA-menetelmää käyttää seoksiin, joiden koostumus on tiedossa, on tällä hetkellä saatavana vain rajallisesti tietoa (18) (19). DPRA-menetelmän katsotaan kuitenkin olevan teknisesti käytettävissä monesta aineosasta muodostuvien aineiden testaamiseen sekä sellaisten seosten testaamiseen, joiden koostumus on tiedossa (ks. 18 kohta). Ennen kuin tällä testimenetelmällä testataan seosta, jotta testillä voidaan tuottaa tuloksia haluttua, sääntelyyn perustuvaa tarkoitusta varten, olisi pohdittava sitä, saadaanko testillä riittävät tulokset kyseiseen tarkoitukseen, ja jos saadaan, niin miksi. Tällaisia pohdintoja ei tarvita, kun sääntely edellyttää kyseisen seoksen testaamista. Nykyistä ennustemallia ei voida käyttää monimutkaisiin seoksiin, joiden koostumus ei ole tiedossa, tai aineisiin, joiden koostumus ei ole tiedossa tai se vaihtelee, monimutkaisiin reaktiotuotteisiin tai biologisiin aineisiin (eli UVCB-aineisiin) testikemikaalin ja peptidin tarkan moolisuhteen vuoksi. Tähän tarkoitukseen on kehitettävä uusi ennustemalli, joka perustuu gravimetriseen menetelmään. Testimenetelmällä ei pidä testata tiettyjä muita kemikaaliluokkia, joiden testaamiseen se ei todistetusti sovellu.

Tämä testimenetelmä on *in chemico* -menetelmä, jota ei tehdä metabolisessa järjestelmässä. Testimenetelmä ei tunnista kemikaaleja, joiden kohdalla ihon herkistyminen edellyttää entsymaattista bioaktivointia (eli pro-hapteeneja). Testimenetelmän on todettu havaitsevan toisinaan oikein kemikaalit, joista tulee herkistäviä abioottisen transformaation jälkeen (pre-hapteenit) (18). Edellä esitetyn valossa testimenetelmällä saatuja negatiivisia tuloksia pitäisi tulkita ottaen huomioon esitetyt rajoitukset sekä yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa. Testikemikaalit, jotka eivät muodosta kovalenttisidosta peptidiin vaan edistävät sen hapettumista (kysteiinidimerisaatio), voivat aiheuttaa peptidideplection yliarvioinnin, mikä saattaa mahdollisesti johtaa virheelliseen positiiviseen ennusteeseen ja/tai siihen, että kemikaali luokitellaan ylempään reaktiivisuusluokkaan (ks. 29 ja 30 kohta).

Kuten edellä on kuvattu, DPRA auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin (11) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATA:ta. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten DPRA-menetelmän tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

TESTIN PERIAATE

DPRA on *in chemico* -menetelmä, jolla kvantifioidaan kysteiinia tai lysiinia sisältävän peptidin jäännöspitoisuus, kun sitä on inkuboitu 24 tuntia testikemikaalin kanssa 25 ± 2,5 °C:ssa. Synteettiset peptidit sisältävät fenyylialaniinia, joka auttaa havaitsemisessa. Suhteellinen peptidipitoisuus mitataan korkean suorituskyvyn nestekromatografialla (HPLC) käyttäen gradienttieluutiota ja UV-detektiota (220 nm). Tämän jälkeen lasketaan kysteiini- ja lysiinipeptidin prosentuaaliset depleetioarvot, joita käytetään ennustemallissa (ks. 29 kohta); sen avulla testikemikaali luokitellaan yhteen neljästä reaktiivisuusluokasta, joiden avulla ihoa herkistävät kemikaalit erotetaan muista kemikaaleista.

Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään rutiininomaisesti tämän testimenetelmän mukaista menetelmää, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla.

MENETTELY

Testimenetelmä perustuu DPRA DB-ALM -testiprotokollaan nro 154 (20), joka on EURL:n ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa käytettävä protokolla. Suosituksena on käyttää tätä protokollaa, kun menetelmä otetaan käyttöön ja sitä käytetään laboratoriossa. Seuraavassa kuvataan DPRA:n päävaiheet ja menettelyt. Vaihtoehtoista HPLC-mittausta käytettäessä on osoitettava sen vastaavan DB-ALM-protokollassa kuvattua validoitua mittausta (esimerkiksi tekemällä testi lisäyksessä 2 luetelluilla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla).

Kysteiinia tai lysiinia sisältävien peptidien valmistelu

Kysteiinia (Ac-RFAA**C**AA-COOH) ja lysiiniä (Ac-RFAA**K**AA-COOH) sisältäviä synteettisiä peptidejä sisältävät kantaliuokset pitäisi valmistaa juuri ennen niiden inkubointia testikemikaalin kanssa, ja niiden puhtausasteen on oltava yli 85 prosenttia ja mieluiten 90–95 prosenttia. Kysteiinipeptidin lopullisen pitoisuuden pitäisi olla 0,667 mM fosfaattipuskurissa, jonka pH-arvo on 7,5, kun taas lysiinipeptidin lopullisen pitoisuuden pitäisi olla 0,667 mM ammoniumasetaattipuskurissa, jonka pH-arvo on 10,2. HPLC-ajosekvenssi pitäisi suunnitella siten, että HPLC-analyysi kestää alle 30 tuntia. Validointitutkimuksessa käytettävässä ja tässä testimenetelmässä kuvatussa HPLC-mittauksessa yksi HPLC-ajo voi käsittää jopa 26 analyysinäytettä (jotka käsittävät testikemikaalin, positiivisen kontrollin ja sopivan määrän liuotinkontrolleja testissä käytettyjen yksittäisten liuottimien määrän mukaan, ja näistä kukin testataan kolmesti). Kaikissa samassa ajossa analysoiduissa rinnakkaisnäytteissä pitäisi käyttää täysin samaa kysteiini- ja lysiinipeptidikantaliuosta. Yksittäisten peptidierien liukoisuuden asianmukaisuus on suositeltavaa osoittaa ennen niiden käyttöä.

Testikemikaalin valmistelu

Testikemikaalin liukoisuutta sopivaan liuottimeen pitäisi arvioida ennen testin tekemistä DPRA DB-ALM -protokollassa kuvatun liukoisuusmenettelyn mukaisesti (20). Sopivaan liuottimeen testikemikaali liukenee täysin. Koska DPRA:ssa testikemikaalia, jota inkuboidaan joko kysteiini- tai lysiinipeptidien kanssa, on huomattavasti tarvittavaa suurempi määrä, silmämääräistä tarkastusta, jossa todetaan kirkkaan liuoksen muodostuminen, pidetään riittävänä keinona varmistaa testikemikaalin (ja kaikkien sen aineosien, jos testattava kemikaali on monesta aineosasta muodostuva aine tai seos) liukeneminen. Sopivia liuottimia ovat asetonitriili, vesi, asetonitriilin, isopropanolin tai asetonin ja veden seos, jonka sekoitussuhde on 1:1, taikka asetonin ja asetonitriilin seos, jonka sekoitussuhde on 1:1. Muita liuottimia voidaan käyttää, kunhan ne eivät vaikuta peptidin stabiilisuuteen, jota seurataan C-vertailukontrollien avulla (tällä tarkoitetaan näytteitä, joissa sopivaan liuottimeen on liuotettu pelkkää peptidiä; ks. lisäys 3). Ellei testikemikaali liukene mihinkään näistä liuottimista, viimeisenä vaihtoehtona on yritettävä liuottaa se 300 µL:aan dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja liuottaa näin syntyvä liuos 2 700 µL:aan asetonitriiliä, ja ellei testikemikaali liukene tähänkään seokseen, on yritettävä liuottaa sama määrä testikemikaalia 1 500 µL:aan dimetyylisulfoksidia ja liuottaa näin syntyvä liuos 1 500 µL:aan asetonitriiliä. Testikemikaali on punnittava ja annosteltava etukäteen lasipulloihin ja liuotettava välittömästi ennen testaamista sopivaan liuottimeen 100 mM:n liuokseksi. Kun kyseessä on seos tai monesta aineosasta koostuva aine, jonka koostumus on tiedossa, on määritettävä sen yleinen puhtausaste laskemalla yhteen aineosien suhteet (lukuun ottamatta vettä) sekä määritettävä yleinen näennäinen molekyylimassa ottamalla huomioon seoksen kunkin aineosan molekyylimassat (lukuun ottamatta vettä) ja niiden suhteet. Näin lasketun puhtausasteen ja näennäisen molekyylimassan perusteella pitäisi sitten laskea 100 mM:n liuoksen valmistamiseen tarvittavan testikemikaalin massa. Kun kyseessä on polymeeri, jonka vallitsevaa molekyylimassaa ei voida määrittää, 100 mM:n liuoksen valmistuksessa voidaan ottaa huomioon monomeerin molekyylimassa (tai polymeerin sisältämien eri monomeerien näennäinen molekyylimassa). Testattaessa seoksia, monesta aineosasta koostuvia aineita tai polymeereja, joiden koostumus on tiedossa, on kuitenkin harkittava myös laimentamattoman kemikaalin testaamista. Kun kyseessä on neste, laimentamatonta kemikaalia pitäisi testata sellaisenaan ilman etukäteisliuotusta inkuboimalla sitä kysteiini- ja lysiinipeptidien kanssa, niin että moolisuhde on 1:10 kysteiinipeptidien ja 1:50 lysiinipeptidien tapauksessa. Kun kyseessä on kiinteä aine, testikemikaalia on liuotettava suurin liukeneva määrä samaan liuottimeen, jota käytetään näennäisesti 100 mM:n liuoksen valmistamiseen. Tämän jälkeen sitä pitäisi testata sellaisenaan tekemättä muita liuotuksia inkuboimalla sitä kysteiini- ja lysiinipeptidien kanssa, niin että moolisuhde on 1:10 kysteiinipeptidien ja 1:50 lysiinipeptidien tapauksessa. Tuloksesta voidaan tehdä pysyvä päätelmä, jos näennäisesti 100 mM:n liuoksella ja liuottamattomalla kemikaalilla saadut tulokset ovat yhtäpitävät (reaktiivinen/ei-reaktiivinen).

Positiivisen kontrollin, vertailukontrollien ja koeluointikontrollien valmistelu

Positiivisena kontrollina (PC) pitäisi käyttää kanelialdehydia (CAS 104-55-2; ≥95 % puhtaudeltaan elintarvikelaatuista), joka on liuotettu asetonitriiliin, niin että pitoisuus on 100 mM. On myös mahdollista käyttää muita sopivia positiivisia kontrolleja, joilla mieluiten saadaan keskitasoa edustavat depleetioarvot, jos saatavilla on aiempia tietoja, joista saadaan vertailukelpoiset ajon hyväksyttävyysperusteet. Lisäksi HPCL-testijaksoon pitäisi kuulua myös vertailukontrolleja (eli näytteitä, jotka sisältävät vain sopivaan liuottimeen liuotettua peptidiä), joiden avulla varmistetaan HPLC-järjestelmän sopivuus ennen analyysia (A-vertailukontrollit) ja vertailukontrollien stabiilisuus ajan mittaan (B-vertailukontrollit) ja se, että testikemikaalin liuottamiseen käytetty liuotin ei vaikuta peptidin depleetioasteeseen (C-vertailukontrollit) (ks. lisäys 3). Kullekin kemikaalille sopivan vertailukontrollin avulla lasketaan peptidin depleetioaste kyseisen kemikaalin osalta (ks. 26 kohta). Lisäksi ajosekvenssiin pitäisi kuulua kunkin analysoitavan testikemikaalin osalta pelkästä testikemikaalista muodostuva koeluutiokontrolli, jotta voidaan havaita testikemikaalin mahdollinen koeluutio joko lysiini- tai kysteiinipeptidin kanssa.

Testikemikaalin inkubointi kysteiini- ja lysiinipeptidiliuosten kanssa

Kysteiini- ja lysiinipeptidiliuoksia on inkuboitava automaattisen näytteensyöttölaitteen lasipulloissa testikemikaalin kanssa niin, että kysteiiniliuoksen sekoitussuhde on 1:10 ja lysiiniliuoksen 1:50. Jos välittömästi sen jälkeen, kun testikemikaaliliuosta on lisätty peptidiliuokseen, havaitaan saostumista, joka johtuu testikemikaalin heikosta liukenevuudesta veteen, on epävarmaa, miten paljon testikemikaalia liuokseen jää reagoimaan peptidin kanssa. Siksi positiivinen tulos on tällöin edelleen käyttökelpoinen, mutta negatiivinen tulos on epävarma ja sitä on tulkittava asianmukaisella varovaisuudella (ks. myös kohdan 11 vaatimukset sellaisten kemikaalien testaamisesta, jotka eivät liukene 100 mM:n pitoisuutena). Reaktioliuosta pidetään pimeässä 25 ± 2,5 °C:ssa 24 ± 2 tuntia ennen HPLC-analyysin tekemistä. Kukin testikemikaali on analysoitava kolmesti kummankin peptidin osalta. Ennen HPLC-analyysia näytteet on tarkastettava silmämääräisesti. Jos näytteissä havaitaan sakkaa tai faasiutumista, ne voidaan sentrifugoida alhaisella nopeudella (100–400 xg), niin että sakka laskeutuu pullon pohjaan; tämä on varotoimenpide, sillä suuri sakkamäärä voi tukkia HPLC-laitteen putket tai kolonnit. Inkubointivaiheen aikana havaittu saostuminen tai faasiutuminen on merkki siitä, että peptididepleetio saatetaan aliarvioida, eikä negatiivisen tuloksen pohjalta voida tehdä riittävällä varmuudella päätelmää reaktiivisuuden puuttumisesta.

HPCL-standardikalibrointikäyrän laatiminen

Kysteiini- ja lysiinipeptideille on laadittava standardikalibrointikäyrät. Niiden laadinnassa on käytettävä liuosta, jossa asetonitriili suhde puskuriin on 20 tai 25 prosenttia, niin että kysteiinipeptidin tapauksessa käytetään fosfaattipuskuria (pH 7,5) ja lysiinipeptidin tapauksessa käytetään ammoniumasetaattipuskuria (pH 10,2). Peptidikantaliuoksesta (0,667mM) valmistetaan laimentamalla kuuden kalibrointiliuoksen sarja, joka kattaa pitoisuusalueen 0,534–0,0167 mM. Standardikalibrointikäyrään pitäisi sisältyä myös nollanäyte, joka sisältää pelkkää laimennuspuskuria. Sopivassa kalibrointikäyrässä $r^2 > 0,99$.

HPLC-analyysin valmistelu ja suorittaminen

Ennen analyysin tekemistä on varmistettava HPCL-järjestelmän sopivuus. Peptididepleetiota seurataan HPLC-järjestelmällä, joka on liitetty UV-detektoriin (valodiodirividetektori tai kiinteän aallonpituuden absorptiodetektori; signaali 220 nm). HPLC-järjestelmään asennetaan sopiva kolonni. Validoidussa protokollassa kuvatussa HPLC-laitteistossa käytettävä kolonni on ensisijaisesti Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm × 3.5 µ. Tätä HPLC-käänteisfaasikolonnia käytettäessä koko järjestelmä pitäisi tasapainottaa 30 °C:ssa, niin että 50 prosenttia on faasia A (0,1 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahappoa vedessä) ja 50 prosenttia on faasia B (0,085 tilavuusprosenttia

trifluoroetikkahappoa asetonitriilissä) vähintään kaksi tuntia ennen analyysin suorittamista. HPLC-analyysissa käytettävä virtausnopeus on 0,35 ml/min, ja lineaarisen gradientin avulla asetonitriili nostetaan 10 prosentista 25 prosenttiin 10 minuutissa, minkä jälkeen asetonitriili nostetaan nopeasti 90 prosenttiin muiden aineiden poistamiseksi. Standardia, näytettä ja kontrollia pitäisi ruiskuttaa yhtä suuret määrät. Ruiskutusten välillä kolonnia on tasapainotettava uudelleen alkuperäisissä olosuhteissa seitsemän minuutin ajan. Erilaista HPLC-käänteisfaasikolonnia käytettäessä edellä kuvattuja järjestelmän muuttujia saattaa olla tarpeen säätää kysteiini- ja lysiinipeptidien sopivan eluution ja integraation varmistamiseksi; tämä koskee myös ruiskutusmäärää, joka voi vaihdella käytettävän järjestelmän mukaan (yleensä 3–10 µl). Vaihtoehtoista HPLC-järjestelmää käytettäessä on tärkeää osoittaa, että se vastaa edellä kuvattua validoitua järjestelmää (esimerkiksi testaamalla lisäyksen 2 mukaiset pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet). Absorbanssia seurataan 220 nm:ssa. Valodiodirividetektoria käytettäessä pitäisi kirjata myös absorbanssi 258 nm:ssa. On huomattava, että jotkin asetonitriilin lähteet voivat vaikuttaa kielteisesti peptidin stabiilisuuteen, ja tätä on arvioitava uutta asetonitriilierää käytettäessä. 220 nm:ssa kirjatun piikin pinta-alan ja 258 nm:ssa kirjatun piikin pinta-alan suhdetta voidaan käyttää koeluution indikaattorina. Kunkin näytteen tapauksessa suhteen sijoittuminen alueelle 90 % < kontrollinäytteiden suhteen keskiarvoalue ([1]) <100 % olisi hyvä merkki siitä, että koeluutiota ei ole tapahtunut.

Jotkin testikemikaalit saattavat edistää kysteiinipeptidin hapettumista. Dimerisoituneen kysteiinipeptidin piikkiä voidaan seurata silmämääräisesti. Jos dimerisaatiota näyttää tapahtuneen, tämä on otettava huomioon, sillä peptidin depleetioaste saatetaan yliarvioida, mikä johtaa vääriin positiivisiin ennusteisiin ja/tai siihen, että kemikaali luokitellaan korkeampaan reaktiivisuusluokkaan (ks. 29 ja 30 kohta).

Kysteiini- ja lysiinipeptidien HPLC-analyysi voidaan tehdä samanaikaisesti (jos käytettävissä on kaksi HPLC-järjestelmää) tai eri päivinä. Jos analyysit tehdään eri päivinä, testejä varten on kumpanakin päivänä valmistettava tuoreet testikemikaaliliuokset. Analyysi pitäisi ajoittaa niin, että ensimmäisen näytteen ruiskutus alkaa 22–26 tuntia sen jälkeen, kun testikemikaali on sekoitettu peptidiliuokseen. HPLC-ajosekvenssi pitäisi suunnitella siten, että HPLC-analyysi kestää alle 30 tuntia. Validointitutkimuksessa käytetty ja tässä testimenetelmässä kuvattu HPLC-järjestelmä mahdollistaa jopa 26 analyysinäytteen käsittelyn yhdessä HPLC-ajossa (ks. myös 17 kohta). HPLC-analyysisekvenssistä annetaan esimerkki lisäyksessä 3.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Kysteiini- tai lysiinipeptidin pitoisuus kussakin näytteessä määritetään fotometrisesti 220 nm:ssa mittaamalla piikin pinta-ala (käyrän alapuolinen alue, AUC) asianmukaisista piikeistä ja laskemalla peptidipitoisuus käyttämällä standardeista saatua lineaarista kalibrointikäyrää.

Peptidin depleetioaste (%) määritetään kustakin näytteestä mittaamalla piikin pinta-ala ja jakamalla se relevanttien C-vertailukontrollien (ks. lisäys 3) keskimääräisellä piikin pinta-alalla jäljempänä kuvatun kaavan mukaisesti.

$$\textit{Peptidin depleetioaste} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Peptidin piikin ala toistoruiskutuksessa}}{\textit{Peptidin piikin keskimääräinen ala C-vertailukontrolleissa}}\right)\right] \times 100$$

Hyväksyntäperusteet

Jotta ajoa voidaan pitää luotettavana, seuraavien perusteiden on täytyttävä:

a) standardikalibrointikäyrän $r^2 > 0{,}99$

([1]) Keskiarvolla tarkoitetaan koko asiakirjassa aritmeettista keskiarvoa.

b) positiivisena kontrollina käytettävällä kanelialdehydillä tehdyn kolmen toiston osalta peptidin keskimääräisen prosentuaalisen depleetioasteen pitäisi olla 60,8–100 prosenttia kysteiinipeptidin tapauksessa ja 40,2–69,0 lysiinipeptidin tapauksessa, ja positiivisella kontrollilla tehtyjen toistojen suurimman keskihajonnan (SD) pitäisi olla < 14,9 prosenttia kysteiinin depleetioarvon ja < 11,6 prosenttia lysiinin depleetioarvon osalta; ja

c) A-vertailukontrollien keskimääräisen peptidipitoisuuden pitäisi olla 0,50 ± 0,05 mM, ja yhdeksän B- ja C-vertailukontrollin osalta (liuotettu asetonitriiliin) peptidien piikin pinta-alan variaatiokertoimen (CV) pitäisi olla <15,0 prosenttia.

Jos yksi tai useampi näistä ehdoista ei täyty, ajo on toistettava.

Jotta testikemikaalin tuloksia voidaan pitää luotettavina, seuraavien perusteiden on täytyttävä:

a) testikemikaalilla tehtyjen toistojen keskihajonta saa olla enintään < 14,9 prosenttia kysteiinin depleetioasteen ja < 11,6 prosenttia lysiinin depleetioasteen osalta

b) kolmen C-vertailukontrollin keskimääräisen peptidipitoisuuden (sopivassa liuottimessa) pitää olla 0,50 ± 0,05 mM. Elleivät nämä perusteet täyty, testikemikaali on hylättävä ja ajo on toistettava kyseisen testikemikaalin osalta.

Ennustemalli

Kunkin testikemikaalin osalta lasketaan kysteiinin ja lysiinin keskimääräinen prosentuaalinen depleetioaste. Keskiarvoa laskettaessa negatiivinen depleetio katsotaan nollaksi (0). Taulukon 1 mukaista kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallia käyttämällä ihoa herkistävien aineiden ja herkistystä aiheuttamattomien aineiden erottelussa yhdennetyn lähestymistavan (IATA) mukaisesti pitäisi käyttää apuna peptidin keskimääräisen depleetioasteen 6,38 prosentin raja-arvoa. Ennustemallin käyttö testikemikaalin reaktiivisuusluokittelussa (esimerkiksi vähäinen, kohtalainen, suuri reaktiivisuus) saattaa osoittautua hyödylliseksi keinoksi hankkia tietoja potentiaalin arviointiin IATA:n puitteissa.

Taulukko 1

Kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemalli (1)

Kysteiinin ja lysiinin keskimääräinen depleetioaste (%)	Reaktiivisuusluokka	DPRA-ennuste (2)
0 % ≤ keskimääräinen depleetioaste (%) ≤ 6,38 %	Ei reaktiivisuutta tai hyvin vähäinen reaktiivisuus	Negatiivinen
6,38 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 22,62 %	Vähäinen reaktiivisuus	Positiivinen
22,62 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 42,47 %	Kohtalainen reaktiivisuus	
42,47 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 100 %	Suuri reaktiivisuus	

(1) Luvut viittaavat tilastollisiin raja-arvoihin eivätkä liity mittauksen tarkkuuteen.
(2) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n sekä kohtien 9 ja 12 vaatimusten valossa.

Joissakin tapauksissa testikemikaali (aine, useammasta aineosasta koostuvan aineen yksi tai useampi aineosa tai seos) saattaa absorboida merkittävästi 220 nm:ssa ja sillä on sama peptidin retentioaika (koeluutio). Koeluutio saattaa ratketa siten, että HPLC-mittausta säädetään hieman niin, että testikemikaalin ja peptidin eluutioaika erotetaan toisistaan. Jos koeluutio yritetään ratkaista käyttämällä vaihtoehtoista HPLC-mittausta, on osoitettava, että se vastaa validoitua mittausta (esimerkiksi tekemällä testi liitteen 2 mukaisilla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla). Koeluution tapahtuessa peptidin piikkiä ei voida integroida eikä peptidin prosentuaalista depleetioastetta voida laskea. Jos näiden testikemikaalien koeluutiota tapahtuu sekä kysteiini- että lysiinipeptidin kanssa, on todettava, ettei analyysin pohjalta voida tehdä varmoja päätelmiä. Jos koeluutiota tapahtuu vain lysiinipeptidin kanssa, voidaan käyttää taulukon 2 mukaista kysteiini 1:10 -ennustemallia.

Taulukko 2

Kysteiini 1:10 -ennustemalli (1)

Kysteiinin (Kys.) depleetioaste (%)	Reaktiivisuusluokka	DPRA-ennuste (2)
0 % ≤ Kys. depleetioaste (%) ≤ 13,89 %	Ei reaktiivisuutta tai hyvin vähäinen reaktiivisuus	Negatiivinen
13,89 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 23,09 %	Vähäinen reaktiivisuus	Positiivinen
23,09 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 98,24 %	Kohtalainen reaktiivisuus	
98,24 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 100 %	Suuri reaktiivisuus	

(1) Luvut viittaavat tilastollisiin raja-arvoihin eivätkä liity mittauksen tarkkuuteen.
(2) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n sekä kohtien 9 ja 12 vaatimusten valossa.

Joissakin tapauksissa on mahdollista, että testikemikaalin ja jommankumman peptidin retentioajan päällekkäisyys jää vaillinaiseksi. Tällaisissa tapauksissa peptidin prosentuaaliset depleetioarvot voidaan arvioida ja niitä voidaan käyttää kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallissa, mutta testikemikaalin tarkka reaktiivisuusluokittelu ei ole mahdollista.

Yhden HPLC-analyysin pitäisi riittää niin kysteiini- kuin lysiinipeptidinkin osalta yhtä testikemikaalia kohden, kun tulos on yksiselitteinen. Lisätestit saattavat kuitenkin olla tarpeen silloin, kun tulokset sijoittuvat lähelle positiivisten ja negatiivisten tulosten erotteluun käytettävää raja-arvoa. Tilanteissa, joissa keskimääräinen depleetioaste on 3–10 prosenttia kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallissa tai kysteiinin prosentuaalinen depleetioaste on 9–17 prosenttia kysteiini 1:10 -ennustemallissa, on harkittava toista ajoa; lisäksi on harkittava kolmatta ajoa siinä tapauksessa, että kahden ensimmäisen ajon tulokset ovat keskenään ristiriidassa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— Yhdestä aineosasta koostuva aine

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylimassa ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— Useammasta aineosasta koostuva aine, koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine sekä seos

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja aineosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylimassa tai näennäinen molekyylimassa, kun kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Kontrollit

— Positiivinen kontrolli

— kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylimassa ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

— Liuotin/kantaja-aine

— tarvittaessa käytetty liuotin/kantaja-aine ja sen aineosien suhde

— kemiallinen nimi (kemialliset nimet), kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet) sekä CAS-numero(t) ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testimenetelmässä mainittuja, ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— perustelut liuottimen valinnalle kunkin testikemikaalin osalta

— asetonitriilin osalta peptidin stabiilisuuteen kohdistuvaa vaikutusta koskevan testin tulokset.

Peptidien, positiivisen kontrollin ja testikemikaalin valmistelu

— peptidiliuosten luonnehdinta (toimittaja, erä, peptidin tarkka paino, kantaliuosta varten lisättävä volyymi)

— positiivisen kontrolliliuoksen luonnehdinta (positiivisen kontrolliaineen tarkka paino, testiliuosta varten lisättävä volyymi)

— testikemikaaliliuosten luonnehdinta (testikemikaalin tarkka paino, testiliuosta varten lisättävä volyymi).

HPLC-laitekokoonpano ja -analyysi

— HPLC-laitteen tyyppi, HPLC- ja suojakolonnit, detektori, automaattinen näytteensyötölaite

— HPLC-analyysin kannalta olennaiset parametrit, kuten kolonnin lämpötila, ruiskutusten tilavuudet, virtausnopeus ja gradientti.

Järjestelmän soveltuvuus

— peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa standardin ja A-vertailukontrollin kunkin toiston osalta

— lineaarinen kalibrointikäyrä graafisesti esitettynä ja raportoitu r^2

— A-vertailukontrollin kunkin toiston peptidipitoisuus

— kolmen vertailukontrollin (A, SD ja CV) keskimääräinen peptidipitoisuus (mM)

— A- ja C-vertailukontrollien peptidipitoisuus.

Analyysisekvenssi

— Vertailukontrollien osalta:

  — B-ja C-vertailukontrollien kunkin toiston peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

  — yhdeksän vertailukontrollin (B ja C asetonitriilissa, SD ja CV) keskimääräinen peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa (jotta voidaan määrittää vertailukontrollien stabiilisuus analyysiajan mittaan)

  — kunkin käyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-vertailukontrollin keskimääräinen peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa (peptidin prosentuaalisen depleetioasteen laskentaa varten)

  — kunkin käytetyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-vertailukontrollin peptidipitoisuus (mM)

  — kunkin käytetyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-, SD- ja CV-vertailukontrollin keskimääräinen peptidipitoisuus.

— Positiivisen kontrollin osalta:

  — kunkin toiston osalta peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

  — kunkin toiston osalta peptidin prosentuaalinen depleetioaste

  — kolmen toiston, SD:n ja CV:n osalta keskimääräinen peptidin depleetioaste

— Kunkin testikemikaalin osalta:

  — tieto sakasta reaktioseoksessa inkubaatioajan lopussa, jos sellaista havaitaan; Tieto mahdollisesta sakan uudelleen liuottamisesta tai sentrifugoinnista

— tieto koeluution tapahtumisesta

— tarvittaessa muiden mahdollisten olennaisten havaintojen kuvaus

— kunkin toiston osalta peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

— kunkin toiston osalta peptidin prosentuaalinen depleetioaste

— kolmen toiston, SD:n ja CV:n osalta keskimääräinen peptidin prosentuaalinen depleetioaste

— kysteiinin ja lysiinin keskimääräiset prosentuaaliset depleetioasteet

— käytetty ennustemalli ja DPRA-ennuste.

Pätevyyden testaaminen

— Tarvittaessa menettely, jolla osoitetaan, että laboratorio on pätevä suorittamaan testimenetelmän (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen), tai jolla osoitetaan testimenetelmän toistettavuus ajan mittaan.

Tulosten tarkastelu

— DPRA-testimenetelmällä saatujen tulosten tarkastelu

— testimenetelmän tulosten tarkastelu IATA:n valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Tässä liitteessä oleva B.6 luku: Ihoherkistys.

(4) Tässä liitteessö oleva B.42 luku: Paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(5) Tässä liitteessä oleva B.50 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(6) Tässä liitteessä oleva B.51 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä BrdU-ELISA:

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85: 367–485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81: 332–343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97: 417–427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489–504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27: 609–618.

(14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60: 389–400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64: 625–639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22s. Saatavilla osoitteessa www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, mukaan lukien tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimet, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (1).

Haittavaikutusreitti (Adverse Outcome Pathway, AOP): Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (2).

Herkkyys: Testimenetelmällä oikein luokiteltujen positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (21).

Järjestelmän soveltuvuus: Välineen suorituskyvyn (esimerkiksi herkkyyden) määrittäminen referenssinormaalin analysoinnilla ennen analyysierän ajamista (22).

Kalibrointikäyrä: Kokeellisen vastearvon ja tunnetun aineen analyyttisen pitoisuuden välinen suhde (josta käytetään myös nimitystä *vakiokäyrä*).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Käynnistävä molekyylitason tapahtuma: Kemikaalin aiheuttama, molekyylitasolla tapahtuva biologisen järjestelmän häiriö, joka on määritetty haittavaikutusreitin käynnistäväksi tapahtumaksi.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus (21).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (21).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta aineesta ja jossa nämä aineet eivät reagoi (1).

Spesifisyys: Testimenetelmällä oikein luokiteltujen negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon testimenetelmän merkityksellisyyttä arvioitaessa (21).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (21).

Testikemikaali: Termillä ”testikemikaali” viitataan siihen, mitä testataan.

Useasta aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta aineosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta aineosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta aineosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Uusittavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti tehdyillä testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (21).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (21).

Variaatiokerroin: Variaation mittayksikkö, joka lasketaan toistoista saatujen tietojen pohjalta jakamalla normaalijakauma keskiarvolla. Variaatiokerroin voidaan ilmaista prosenttilukuna kertomalla se 100:lla.

Vertailukontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin (Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Yhdestä aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Järjestelmä, jossa kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

In chemico -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)

Ennen kuin laboratoriot ottavat tämän testimenetelmän rutiininomaiseen käyttöön, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä saamalla oikea, odotettava DPRA-ennuste 10:lle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle, joita suositellaan taulukossa 1, ja saamalla kysteiinin ja lysiinin depeetioarvot, jotka osuvat niille määritettyihin viiteväleihin, kahdeksalla aineella kymmenestä kunkin peptidin osalta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu niin, että ne edustavat erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaraan.. Valintakriteereihin kuului myös se, että niitä on kaupallisesti saatavana, että saatavana on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja laadukkaita DPRA:lla tuotettuja *in vitro* -tietoja ja että niitä käytettiin EURL ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa sen osoittamiseen, että testimenetelmän käyttöönotto onnistui tutkimukseen osallistuneissa laboratorioissa.

Taulukko 1

Suositellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet DPRA-kokeeseen liittyvän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste (1)	DPRA-ennuste (2)	Kysteiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli (3)	Lysiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli (3)
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	90-100	15-45
Oksatsolooni	15646-46-5	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	60-80	10-55
Formaldehydi	50-00-0	Nestemäinen	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	30-60	0-24
Bentsylideeniasetoni	122-57-6	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	80-100	0-7
Farnesaali	19317-11-4	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	15-55	0-25
2,3-butaanidioni;	431-03-8	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	60-100	10-45
1-butanoli	71-36-3	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5
6-metyylikumariini	92-48-8	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste (1)	DPRA-ennuste (2)	Kysteiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli (3)	Lysiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli (3)
Maitohappo	50-21-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5
4-metoksiasetofenoni	100-06-1	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5

(1) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (19). *In vivo* -vaikutuskyvyn määrityksessä on käytetty ECETOCin esittämiä kriteereitä (23).
(2) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n ja kohtien 9 ja 11 määräysten valossa.
(3) Vaihteluvälit on määritetty vähintään 10 depleetioarvon pohjalta; arvot ovat kuuden riippumattoman laboratorion tuottamia.

Lisäys 3

ESIMERKKEJÄ ANALYYSISEKVENSSISTÄ

Kalibrointistandardit ja vertailukontrollit	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Laimennuspuskuri Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 1 Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 2 Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 3
Koeluutiokontrollit	Koeluutiokontrolli 1, testikemikaali 1 Koeluutiokontrolli 2, testikemikaali 2
Vertailukontrollit	Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 1 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 2 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 3
Ensimmäinen rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, rinnakkaisnäyte 1 Kanelialdehydi, rinnakkaisnäyte 1 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 1 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 1
Toinen rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, näyte 2 Kanelialdehydi, näyte 2 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 2 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 2
Kolmas rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, rinnakkaisnäyte 3 Kanelialdehydi, näyte 3 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 3 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 3
Vertailukontrollit	Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 4 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 5 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 6

Analyysisekvenssin pitäisi sisältää kolme vertailukontrollisarjaa (eli näytteitä, jotka muodostuvat vain sopivaan liuottimeen liuotetusta peptidistä).

Vertailukontrollia A käytetään HPLC-järjestelmän soveltuvuuden varmistamiseen.

Vertailukontrollia B käytetään analyysisekvenssin alussa ja lopussa sen varmistamiseen, että vertailukontrollit säilyvät stabiileina analyysin ajan.

Vertailukontrollia C käytetään analyysisekvenssissä sen varmistamiseen, että testikemikaalin liuottamiseen käytetty liuotin ei vaikuta peptidin prosentuaaliseen depleetioarvoon.

B.60 *In vitro* -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmä

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 442D (2015). Ihoa herkistävällä aiheella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. [1] Tämä testimenetelmä on *in vitro* -menetelmä (ARE-Nrf2-lusiferaasikoe), joka auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista YK:n GHS-järjestelmän (1) sekä CLP-asetuksen mukaisesti.

Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Olemassa olevat tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty tiivistetysti haittavaikutusreitin (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) muodossa herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta välivaiheiden kautta aina haittavaikutukseen eli ihmisen allergiseen kosketusihottumaan tai jyrsijän kosketusallergiaan (2) (3). Herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin. Toinen keskeinen tapahtuma tässä ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä tapahtuu keratinosyyteissä; se käsittää tulehdusvasteita ja geeniekspression, joka liittyy tiettyihin solujen viestinvälitysreitteihin, kuten antioksidatiivisista/elektrofiilisista vaste-elementeistä (ARE) riippuviin reitteihin. Kolmas keskeinen tapahtuma on dendriittisolujen aktivoituminen, jota arvioidaan yleensä tiettyjen solujen pintamarkkerien, kemokiinien ja sytokiininen, ilmenemisen perusteella. Neljäs keskeinen tapahtuma on T-solujen proliferaatio, jota arvioidaan välillisesti hiirille tehdyllä LLNA-kokeella (Local Lymph Node Assay) (4).

Ihon herkistymisen arvioinnissa on käytetty yleensä koe-eläimiä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnusson–Kligmanin GMPT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6 (5)) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Myös hiirillä tehty LLNA-koe (Local Lymph Node Assay) (TM B.42 (4)) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta (LLNA: DA (TM B.50 (6)) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testausmenetelmät on katsottu tieteellisesti valideiksi menetelmiksi kemikaalien ihoherkistysvaaran arviointiin. Jotta käytössä olevat eläinkokeet voidaan korvata täysin, testausta ja arviointia koskeviin yhdennettyihin lähestymistapoihin (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) tarvitaan kuitenkin eläinkokeettomien menetelmien (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) yhdistelmiä, sillä kullakin nykyisin käytettävissä olevalla eläinkokeettomalla testimenetelmällä voidaan kattaa haittavaikutusreitti mekanistisesti vain rajallisesti (2) (3).

Tällä testimenetelmällä (ARE-Nrf2-lusiferaasikokeella) on tarkoitus tutkia toista keskeistä tapahtumaa, joka kuvataan kohdassa 2. Ihoa herkistävien aineiden on raportoitu indusoivan geenejä, joita antioksidatiiviset vaste-elementit (ARE) säätelevät (8) (9). Pienikokoiset elektrofiiliset aineet, kuten ihoa herkistävät aineet, voivat vaikuttaa Keap1-sensoriproteiiniin (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), esimerkiksi kysteiinijäämän kovalenttimuutoksen kautta, minkä seurauksena se irtautuu transkriptiotekijästä Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Irtautunut Nrf2 voi sitten aktivoida ARE-riippuvaisia geenejä, kuten vaiheen II detoksifioivia entsyymejä koodaavia geenejä (8) (10) (11).

Tällä hetkellä ainoa tämän testimenetelmän kattama *in vitro* -ARE-Nrf2-lusiferaasikoe on KeratinoSens™-koe, josta on tehty validointitutkimukset (9) (12) (13), minkä jälkeen Euroopan unionin vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien vertailulaboratorio (EURL ECVAM) on tehnyt riippumattoman vertaisarvioinnin (14). KeratinoSens™-kokeen katsottiin olevan tieteellisesti kelvollinen käytettäväksi osana testausta ja arviointia koskevaa yhtenäistä lähestymistapaa ihoa herkistävien aineiden erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista vaaran luokittelua varten ja merkintätarkoituksiin (14). Laboratoriot, jotka haluavat ottaa testimenetelmän käyttöön, voivat saada KeratinoSens™-kokeessa käytetyn rekombinanttisolulinjan tekemällä lisenssisopimuksen testimenetelmän kehittäjän kanssa (15).

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

Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT, KÄYTETTÄVYYS JA RAJOITUKSET

Koska Keap1-Nrf2-ARE-reitin aktivoituminen liittyy ainoastaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin toiseen keskeiseen tapahtumaan, tällä testimenetelmällä saadut tiedot, jotka perustuvat tämän reitin aktivoitumiseen, eivät todennäköisesti itsessään riitä kemikaalien ihoherkistyspotentiaalia koskevien päätelmien tekemiseen. Siksi tällä testimenetelmällä tuotettuja tietoja pitäisi tarkastella osana kokonaisvaltaista lähestymistapaa (esimerkiksi IATA) yhdistämällä ne muihin, täydentäviin tietoihin, kuten tietoihin, jotka on saatu *in vitro* -kokeilla, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista. Esimerkkejä siitä, miten ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmää voidaan käyttää yhdessä muiden tietojen kanssa, annetaan alan kirjallisuudessa (13) (16) (17) (18) (19).

Tätä testimenetelmää voidaan käyttää apuna ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista osana IATA:ta. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisiin alaluokkiin 1A ja 1B eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntely-kehyksestä riippuen positiivista tulosta voidaan kuitenkin sellaisenaan käyttää kemikaalin luokitteluun YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

Validointitutkimuksesta ja omista testeistä (in-house testing) saatujen, testimenetelmän riippumattomaan vertaisar-viointiin käytettyjen tietojen perusteella KeratinoSens-kokeen on osoitettu olevan siirrettävissä laboratorioihin, joilla on kokemusta soluviljelystä. Testimenetelmällä odotettavien ennusteiden toistettavuus on 85 prosentin luokkaa laboratorioissa ja niiden välillä (14). KeratinoSens™-kokeen tarkkuus (77 prosenttia – 155/201), herkkyys (78 prosenttia – 71/91) ja spesifisyys (76 prosenttia – 84/110) ihoa herkistävien aineiden (eli YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista LLNA-tuloksiin verrattuna laskettiin ottamalla huomioon kaikki EURL ECVAMille tämän testimenetelmän arviointia ja vertaisarviointia varten toimitetut tiedot (14). Nämä luvut ovat samankaltaisia kuin hiljattain julkaistut luvut, jotka perustuvat noin 145 aineen in-house-testaukseen (tarkkuus 77 prosenttia, sensitiivisyys 79 prosenttia ja spesifisyys 72 prosenttia) (13). KeratinoSens™-koe todennäköisesti aliennustaa sitä, että kemikaaleilla on matalasta kohtalainen ihoherkistyspotentiaali (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B) kuin että kemikaaleilla olisi suuri ihoherkistyspotentiaali (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (13) (14). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että KeratinoSens™-koe auttaa hyödyllisellä tavalla tunnistamaan ihon herkistämisvaaran. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat KeratinoSens™-kokeen käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testimenetelmää pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa ja edellä olevan kohdan 9 mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-koe ja muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta kiinnostuksen kohteena olevan lajin eli ihmisen tapauksessa.

Tässä testimenetelmässä käytetään termiä ”testikemikaali”, jolla tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä termi liity siihen, voidaanko ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmää käyttää aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Nykyisten saatavilla olevien tietojen perusteella on osoitettu, että testikemikaalit, joihin KeratinoSens™-koetta voidaan käyttää, kattavat monenlaisia orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ja reaktiomekanismeja ja vaihtelevat ihon herkistämispo-tentiaalin (siten kuin se määritetään *in vivo* -tutkimuksissa) ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksiensa osalta (9) (12) (13) (14). Testatut aineet olivat pääasiassa yhdestä aineosasta muodostuvia aineita, vaikka olemassa onkin myös rajallinen määrä tietoa seosten testaamisesta (20). Testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää teknisesti monesta aineosasta muodostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seokseen tulosten tuottamiseksi haluttua sääntelyyn perustuvaa tarkoitusta varten, olisi kuitenkin pohdittava sitä, antaako se riittävät tulokset kyseiseen tarkoitukseen, ja jos antaa, niin miksi. Tällaisia pohdintoja ei tarvita, kun sääntely edellyttää kyseisen seoksen testaamista. Lisäksi monesta aineosasta muodostuvia aineita tai seoksia testattaessa pitäisi ottaa huomioon sytotoksisten aineosien mahdollinen häiritsevä vaikutus havaittuihin vasteisiin. Testimenetelmää voidaan soveltaa testikemikaaleihin, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion

(eli kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai erotu faaseiksi liuottimesta) joko vedessä tai dimetyylisulfoksidissa (mukaan lukien testikemikaalin kaikki aineosat testattaessa monesta aineosasta muodostuvaa ainetta tai seosta). Jos testikemikaalit eivät täytä näitä ehtoja suurimpana vaadittuna lopullisena pitoisuutena, joka on 2 000 µM (ks. 22 kohta), niitä voidaan silti testata alhaisempina pitoisuuksina. Tällöin kohdassa 39 positiiviselle tulokselle asetetut perusteet täyttävien tulosten perusteella testikemikaali voidaan edelleen määrittää ihoa herkistäväksi aineeksi, kun taas alle 1 000 µM:n pitoisuudella saadusta negatiivisesta tuloksesta ei voida tehdä varmoja päätelmiä (ks. ennustemalli kohdasta 39). Yleisesti aineita, joiden LogP on enintään 5, on testattu onnistuneesti, kun taas testimenetelmää ei tiettävästi voida käyttää sellaisten äärimmäisten hydrofobisten aineiden kanssa, joiden LogP on yli 7 (14). Aineista, joiden LogP on 5–7, on saatavana tietoa vain rajallisesti.

Negatiivisia tuloksia pitäisi tulkita varoen, sillä testimenetelmä voi antaa negatiivisen tuloksen aineista, jotka reagoivat ainoastaan lysiinijäämiin. Lisäksi käytetyn solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (21) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (eli kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien kautta) ja prehapteenit (eli kemikaalit, jotka itsehapetus aktivoi) voivat antaa negatiivisia tuloksia varsinkin hapettumisvauhdin ollessa hidas. Toisaalta testikemikaalit, jotka eivät aiheuta herkistystä mutta ovat kuitenkin kemikaalisia stressitekijöitä, voivat aiheuttaa virheellisiä positiivisia tuloksia (14). Lisäksi erittäin sytotoksisia testikemikaaleja ei voida aina arvioida luotettavasti. Myös lusiferaasientsyymiin häiritsevästi vaikuttavat testikemikaalit voivat sekoittaa lusiferaasin toimintaa solupohjaisissa kokeissa ja aiheuttaa joko ilmeistä inhibitiota tai lisätä luminesenssia (22). Esimerkiksi fytoestrogeenipitoisuuksien, jotka ovat suurempia kuin 1 µM, on raportoitu vaikuttavan häiritsevästi luminesenssisignaaleihin muissa lusiferaasipohjaisissa reportterigeenikokeissa, mikä johtuu lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta (23). Tämän seurauksena lusiferaasiekspressiota, joka on saatu suurilla pitoisuuksilla fytoestrogeeneja tai vastaavia kemikaaleja, joiden epäillään aiheuttavan fytoestrogeenin tavoin lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, on tutkittava huolella (23). Jos voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin.

Sen lisäksi, että KeratinoSens™-koe auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista, se antaa myös pitoisuus-vastetietoja, jotka voivat mahdollisesti auttaa arvioimaan herkistyspotentiaalia, kun menetelmää käytetään osana kokonaisvaltaisia lähestymistapoja, kuten IATA:ta (19). Sen määrittäminen, miten KeratinoSens™-kokeen tulokset voivat auttaa arvioimaan herkistyspotentiaalia (24) ja luokittelemaan herkistäviä aineita YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti, edellyttää kuitenkin lisää työtä, jonka pitäisi mieluiten perustua luotettaviin ihmisistä saatuihin tietoihin.

TESTIN PERIAATE

ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmässä käytetään immortalisoitua adherenttia solulinjaa, joka on saatu ihmisen HaCaT-keratinosyyteistä, jotka on stabiilisti transfektoitu selektoitavalla plasmidilla. Solulinja sisältää lusiferaasigeenin, joka on kosketuksen kautta herkistävien aineiden säätelemäksi tiedetystä geenistä peräisin olevaan ARE-elementtiin yhdistetyn konstitutiivisen promoottorin transkriptionaalisessa kontrollissa (25) (26). Lusiferaasisignaali heijastaa endogeenisten Nrf2-riippuvaisten geenien aktivoitumista herkistävien aineiden vaikutuksesta, ja lusiferaasisignaalin on osoitettu riippuvan Nrf2:sta rekombinatissa solulinjassa (27). Tämä tarjoaa mahdollisuuden mitata lusiferaasigeenin induktiota kvantitatiivisesti (havaitsemalla luminesenssi) käyttämällä vakiintuneita valoa tuottavia lusiferaasisubstraatteja merkkinä Nrf2-transkriptiotekijän aktiivisuudesta soluissa sen jälkeen, kun ne on altistettu elektrofiilisille aineille.

KeratinoSens™-kokeessa testikemikaalit katsotaan positiivisiksi, jos ne indusoivat tilastollisesti merkitsevän, tietyn rajan ylittävän lusiferaasiaktiivisuuden (yli 1,5-kertainen eli 50 prosentin kasvu) tietyn rajan alittavalla pitoisuutella, joka ei merkitsevästi vaikuta solujen elinkykyyn (alle 1 000 µM ja pitoisuus, jolla solujen elinkyky on yli 70 prosenttia (9) (12)). Tätä varten lusiferaasiaktiivisuuden induktiolle määritetään enimmäiskerroin suhteessa (negatiiviseen) liuotinkontrolliin (I_{max}). Lisäksi koska solut altistetaan joukolle testikemikaaleja eri pitoisuuksina, vaste-annoskäyrästä pitäisi interpoloida pitoisuus, joka tarvitaan tilastollisesti merkitsevään rajan ylittävään lusiferaasiaktiivisuuden induktioon ($EC_{1,5}$-arvo) (ks. ohjeet laskelmiin kohdasta 32). Lopuksi pitäisi tehdä rinnakkaisia sytotoksisuusmittauksia, jotta voidaan arvioida, ilmeneekö lusiferaasiaktiivisuuden indusoivia tasoja sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla.

Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tähän testimenetelmään liittyvää ARE-Nrf2-lusiferaasikoetta rutiininomaisesti, niiden pitäisi osoittaa tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2 lueteltujen kymmenen aineen avulla.

Saatavana on suoritusarvostandardeja (PS) (28), jotka helpottavat KeratinoSens™-kokeen kaltaisten uusien tai muunnettujen *in vitro* -ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmien validointia ja mahdollistavat tämän menetelmän oikeaaikaisen muokkaamisen niin, että ne voidaan sisällyttää siihen. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (*Mutual Acceptance of Data*, MAD) taataan ainoastaan PS:n mukaisesti validoitujen testimenetelmien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt ne vastaavaan testausohjeeseen.

MENETTELY

Tällä hetkellä ainoa menetelmä, jonka tämä testimenetelmä kattaa, on tieteellisesti validoitu KeratinoSens™-koe (9) (12) (13) (14). KeratinoSens™-kokeen vakiomenettely (*Standard Operating Procedures*, SOP) on saatavana, ja sitä pitäisi käyttää, kun laboratorio ottaa testimenetelmän käyttöön ja käyttää sitä (15). Laboratoriot, jotka haluavat ottaa testimenetelmän käyttöön, voivat saada KeratinoSens™-kokeessa käytetyn rekombinanttisolulinjan tekemällä lisenssisopimuksen testimenetelmän kehittäjän kanssa. Seuraavissa kappaleissa kuvaillaan ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmän tärkeimmät osat ja menettelyt.

Keratinosyyttiviljelmien valmistelu

Viljelmien valmistelussa pitäisi käyttää transgeenistä solulinjaa, johon on insertoitu vakaasti ARE-elementin säätelemä lusiferaasireportterigeeni (esimerkiksi KeratinoSens™-solulinjaa). Vastaanoton jälkeen soluja propagoidaan (esimerkiksi 2–4 jatkoviljelyä) ja säilytetään pakastettuina homogeenisena kantana. Tästä alkuperäisestä kannasta peräisin olevia soluja voidaan propagoida jatkoviljelyjen enimmäismäärään saakka (joka on KeratinoSensin™ tapauksessa 25), ja niitä käytetään rutiininomaiseen testaamiseen käyttämällä asianmukaista elatusainetta (KeratinoSensin™ tapauksessa kyseeseen tulevat DMEM:ää sisältävä seerumi ja Geneticin).

Testissä käytettävien solujen pitäisi olla 80–90-prosenttisen konfluentteja, ja on varmistettava, ettei solujen anneta koskaan kasvaa täysin konfluenteiksi. Päivä ennen testaamista solut kerätään ja jaetaan 96 kuopan levyihin (KeratinoSensin™ tapauksessa 10 000 solua/kuoppa). Jotta solut jakautuisivat kuoppalevylle määrältään tasaisesti, on pyrittävä välttämään solujen sedimentaatiota siirrostuksen aikana. Ellei näin tehdä, erot kuoppien välillä voivat olla suuret. Kussakin toistossa käytetään kolmea rinnakkaisnäytettä lusiferaasiaktiviteetin mittaamiseen ja yhtä rinnakkaista rinnakkaisnäytettä solujen elinkyvyn testaamiseen.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

Testikemikaali ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. KeratinoSens™-kokeessa käytettävät testikemikaalit liuotetaan dimetyylisulfoksidiin (DMSO) halutun lopullisen pitoisuuden saavuttamiseksi (esimerkiksi 200 mM). Dimetyylisulfoksidiliuoksia voidaan pitää itsesteriloivina, joten steriilisuodatusta ei tarvita. Testikemikaali, joka ei liukene dimetyylisulfoksidiin, liuotetaan steriliin veteen tai viljelyalustaan ja liuokset steriloidaan esimerkiksi suodattamalla. Ellei testikemikaalille ole määritetty molekyylimassaa (MW), KeratinoSens™-kokeessa valmistetaan oletuspitoisuuden mukainen kantaliuos (40 mg/mL eli 4 painoprosenttia tilavuudesta). Muiden liuottimien kuin dimetyylisulfoksidin, veden tai viljelyalustan käytölle on esitettävä riittävät tieteelliset perustelut.

Dimetyylisulfoksidiin liuotetusta testikemikaalista valmistettujen kantaliuosten pohjalta valmistetaan sarja laimennoksia käyttämällä dimetyylisulfoksidia, niin että testattavasta kemikaalista saadaan 12 master-pitoisuutta (jotka ovat KeratinoSens™-kokeessa 0,098–200 mM). Ellei testikemikaali liukene dimetyylisulfoksidiin, master-pitoisuuksien saamiseksi tehtäviin laimennoksiin käytetään steriiliä vettä tai steriiliä viljelyalustaa. Käytetystä liuottimesta riippumatta master-pitoisuudet laimennetaan sitten edelleen 25-kertaisesti seerumia sisältävällä viljelyalustalla, ja lopuksi niitä laimennetaan edelleen 4-kertaisesti, jolloin testatun kemikaalin lopulliset pitoisuudet ovat 0,98–2000 µ–M KeratinoSens™-kokeessa. Muita pitoisuuksia voidaan käyttää, jos se on perusteltua (esimerkiksi sytotoksisuuden tai heikon liukenevuuden vuoksi).

KeratinoSens™-kokeessa käytettävä negatiivinen kontrolli (liuotinkontrolli) on dimetyylisulfoksidi (CAS-nro 67-68-5, puhtaus ≥ 99 prosenttia), jota käytetään kuudessa kuopassa kullakin kuoppalevyllä. Sille tehdään kohdassa 22 kuvattu sama laimennus kuin master-pitoisuuksille, minkä seurauksena negatiivisen kontrollin (liuotinkontrollin) lopullinen pitoisuus on 1 prosentti; tämä pitoisuus ei vaikuta solujen elinkykyyn, ja se vastaa testatun kemikaalin ja positiivisen kontrollin dimetyylisulfoksidipitoisuutta. Ellei testikemikaali liukene dimetyylisulfoksidiin, vaan laimennuksessa on käytettävä vettä, lopullisen testiliuoksen dimetyylisulfoksidipitoisuutta on kaikissa kuopissa säädettävä 1 prosenttiin, niin kuin myös muiden testikemikaalien ja kontrolliaineiden kanssa tehdään.

KeratinoSens™-kokeessa käytettävä positiivinen kontrolli on kanelialdehydi (CAS-nro 14371-10-9, puhtaus ≥ 98 prosenttia), josta valmistetaan dimetyylisulfoksidiin (6,4 mM:n kantaliuos) viiden master-pitoisuuden sarja, joiden pitoisuudet ovat 0,4–6,4 mM ja jotka kohdassa 22 kuvataan master-pitoisuuksien osalta kuvatulla tavalla, niin että positiivisen kontrollin lopullinen pitoisuus on 4–64 µM. Myös muita sopivia positiivisia kontrolleja, joiden tuottamat $EC_{1,5}$-arvot ovat mieluiten keskitasoa, voidaan käyttää, jos saatavana on historiallisia tietoja, joista voidaan johtaa vastaavat ajon hyväksyntäperusteet.

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden annostelu

Kutakin testikemikaalia ja positiivista kontrolliainetta kohden tarvitaan (positiivisen tai negatiivisen) ennusteen saamiseksi yksi koe; se muodostuu vähintään kahdesta riippumattomasta toistosta, joista kukin käsittää kolme rinnakkaisnäytettä (eli n = 6). Jos kahden riippumattoman toiston tulokset ovat keskenään ristiriidassa, on tehtävä kolmas toisto, joka käsittää kolme rinnakkaisnäytettä (eli n = 9). Kukin riippumaton toisto tehdään eri päivinä käyttämällä testikemikaalien tuoretta kantaliuosta ja erikseen kerättyjä soluja. Solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta jatkoviljelystä.

Kohdassa 20 kuvatun siirrostuksen jälkeen soluja viljellään 24 tuntia 96-kuoppaisissa kuoppalevyissä. Tämän jälkeen viljelyaine poistetaan ja korvataan tuoreella viljelyaineella (KeratinoSensin™ tapauksessa 150 µl:n viljelyaine, joka sisältää seerumia, mutta ei Geneticinia), johon lisätään 50 µl 25-kertaisesti laimennettua testikemikaalia ja kontrolliaineita. Jokaisesta levystä pitäisi jättää tyhjäksi ainakin yksi kuoppa (ei soluja eikä käsittelyä) tausta-arvojen arviointia varten.

Käsiteltyjä levyjä inkuboidaan sitten noin 48 tuntia 37 ± 1 °C:ssa, niin että CO_2 -pitoisuus on 5 prosenttia, KeratinoSens™-kokeessa. Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levyt kelmulla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa.

Lusiferaasiaktiivisuuden mittaukset

Asianmukaisten luminesenssilukemien saamiseen vaikuttavat keskeisesti kolme asiaa:

— herkän luminometrin valinta

— valoristikontaminaation välttämiseksi riittävän korkean levymallin valinta

— riittävästi valoa tuottavan lusiferaasisubstraatin käyttö riittävän herkkyyden ja vähäisen vaihtelevuuden varmistamiseksi.

Ennen testaamista on varmistettava näiden kolmen kohdan täyttyminen tekemällä lisäyksessä 3 kuvatut kontrollikoejärjestelyt.

Kun soluja on altistettu KeratinoSens™-kokeessa 48 tuntia testikemikaalille ja kontrolliaineille, ne pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, ja kuhunkin kuoppaan lisätään luminesenssilukemia varten asianmukaista lyysispuskuria 20 minuutiksi huoneenlämpötilassa.

Tämän jälkeen levyt, joissa on solulysaattia, asetetaan luminometriin KeratinoSens™-koetta varten ohjelmoitujen lukemien ottamista varten: (i) kuhunkin kuoppaan lisätään lusiferaasisubstraattia (eli 50 µl), (ii) odotetaan yksi sekunti ja (iii) mitataan lusiferaasiaktiivisuutta kahden sekunnin ajan. Jos esimerkiksi käytetyn luminometrin mallin vuoksi käytetään muita asetuksia, ne on perusteltava. Lisäksi voidaan käyttää hohtosubstraattia, jos lisäyksen 3 mukainen laadunvalvontakoe on tehty onnistuneesti.

Sytotoksisuuden arviointi

Solujen elinkykyisyyttä testaavaa KeratinoSens™ -koetta varten viljelyaine korvataan 48 tunnin altistusajan jälkeen tuoreella viljelyaineella, joka sisältää MTT:tä (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi; CAS-nro 298-93-1) ja soluja inkuboidaan 4 tuntia 37 °C:ssa, niin että ympäristön CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia. Sitten MTT:tä sisältävä viljelyaine poistetaan ja solujen annetaan lysoitua yön yli (esimerkiksi lisäämällä 10-prosenttista SDS-liuosta kuhunkin kuoppaan). Ravistuksen jälkeen mitataan absorptio 600 nm:ssa fotometrilla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

KeratinoSens™-kokeessa lasketaan seuraavat parametrit:

— testatun kemikaalin ja positiivisen kontrollin millä tahansa pitoisuudella havaitun lusiferaasiaktiivisuuden suurin keskimääräinen induktiokerroin (I_{max});

— $EC_{1,5}$-arvo, joka edustaa pitoisuutta, jolla saatiin aikaan se, että lusiferaasiaktiivisuuden induktio ylittää kynnyksen vähintään 1,5-kertaisesti (eli lusiferaasiaktiivisuuden 50-prosenttinen kasvu); ja

— solujen elinkyvyn 50 prosentin ja 30 prosentin heikkenemisen IC_{50}- ja IC_{30}-pitoisuusarvot.

— lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin lasketaan yhtälöllä 1, ja yleinen suurin induktiokerroin (I_{max}) on yksittäisten toistojen keskiarvo.

Yhtälö 1:

$$Induktiokerroin = \frac{(L_{näyte} - L_{nolla})}{(L_{liuotin} - L_{nolla})}$$

jossa

$L_{näyte}$ on testikemikaalikuopan luminesenssilukema

L_{nolla} on luminesenssilukema tyhjässä kuopassa, jossa ei ole soluja ja jota ei käsitellä

$L_{liuotin}$ on keskimääräinen luminesenssilukema kuopissa, joissa on soluja ja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli)

$EC_{1,5}$ lasketaan yhtälöllä 2 käyttämällä lineaarista interpolointia, ja yleinen $EC_{1,5}$ on yksittäisten toistojen geometrinen keskiarvo.

Yhtälö 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_a}{I_b - I_a}\right) + C_a$$

jossa

C_a on alhaisin pitoisuus (µM), jolla induktio on vähintään 1,5-kertainen

C_b on korkein pitoisuus (µM), jolla induktio on alle 1,5-kertainen

I_a on induktiokerroin mitattuna alhaisimmasta pitoisuudesta, jolla induktio on vähintään 1,5-kertainen (kolmesta kuopasta otettujen rinnakkaisnäytteiden keskiarvo)

I_b on induktiokerroin mitattuna korkeimmasta pitoisuudesta, jolla induktio on enintään 1,5-kertainen (kolmesta kuopasta otettujen rinnakkaisnäytteiden keskiarvo)

Elinkyky lasketaan yhtälöllä 3:

Yhtälö 3:

$$Elinkyky = \frac{(V_{näyte} - V_{nolla})}{V_{liuotin} - V_{nolla}} \times 100$$

jossa

$V_{näyte}$ on testikemikaalikuopan MTT-absorptiolukema

V_{nolla} on MTT-absorptiolukema nollakuopasta, joka ei sisällä soluja eikä käsittelyä

$V_{liuotin}$ on keskimääräinen MTT-absorptiolukema kuopista, joissa on soluja ja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli)

IC_{50} ja IC_{30} lasketaan yhtälöllä 4 käyttämällä lineaarista interpolointia, ja yleiset IC_{50} ja IC_{30} ovat yksittäisten toistojen geometrisiä keskiarvoja.

Yhtälö 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a}\right) + C_a$$

jossa

X on laskettava pitoisuuden prosentuaalinen alenema (50 ja 30 IC_{50}:n ja IC_{30}:n osalta)

C_a on pienin pitoisuus (µM), jolla elinkyvyn alenema on vähintään x prosenttia

C_b on suurin pitoisuus (µM), jolla elinkyvyn alenema on enintään x prosenttia

V_a on prosentuaalinen elinkykyisyys pienimmällä pitoisuudella, jolla elinkyvyn alenema on vähintään x prosenttia

V_b on prosentuaalinen elinkykyisyys suurimmalla pitoisuudella, jolla elinkyvyn alenema on enintään x prosenttia

Jokaisen pitoisuuden osalta, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktio on yli 1,5-kertainen, lasketaan tilastollinen merkitsevyys (esimerkiksi kaksisuuntaisella Studentin t-testillä), vertaamalla kolmen rinnakkaisnäytteen luminesenssiarvoja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli) sisältävien kuoppien luminesenssiarvoihin, jotta voidaan määrittää, onko luminesenssiaktiivisuuden induktio tilastollisesti merkitsevä ($p < 0{,}05$). Pienin pitoisuus, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin on vähintään 1,5, ratkaisee $EC_{1,5}$-arvon. Kussakin tapauksessa tarkastetaan, onko tämä arvo pienempi kuin IC_{30}-arvo, mikä viittaa siihen, että solujen elinkyky on vähentynyt alle 30 prosenttia $EC_{1,5}$-arvon määrittävällä pitoisuudella.

Suosituksena on, että tiedot tarkastetaan visuaalisesti graafien avulla. Jos selvää annos-vastekäyrää ei havaita tai jos saatu annos-vastekäyrä on bifaasinen (eli 1,5:n raja ylittyy kahdesti), koe pitäisi toistaa, jotta voidaan varmistaa, johtuuko tämä testikemikaalista vai kokeeseen liittyvästä artefaktista. Jos bifaasinen vaste kyetään toistamaan riippumattomassa kokeessa, on ilmoitettava alhaisempi $EC_{1,5}$-arvo (pitoisuus, jolla 1,5:n raja ylittyy ensimmäistä kertaa).

Niissä harvinaisissa tapauksissa, joissa havaitaan tilastollisesti ei-merkitsevä yli 1,5-kertainen induktio, minkä jälkeen suurempi pitoisuus aiheuttaa tilastollisesti merkitsevän induktion, tämän toiston tuloksia pidetään yhtä valideina ja positiivisina kuin jos 1,5:n rajan ylittävä tilastollisesti merkitsevä induktio olisi saatu ei-sytotoksisella pitoisuudella.

Kun testikemikaalilla saadaan aikaan 1,5-kertainen tai suurempi induktio jo alhaisimmalla testipitoisuudella (0,98 µM), $EC_{1,5}$-arvoksi määritetään alle 0,98 annos-vastekäyrän visuaalisen tarkastuksen perusteella.

Hyväksyntäperusteet

Seuraavien hyväksyntäperusteiden pitäisi täyttyä KeratinoSens™-koetta käytettäessä. Ensinnäkin positiivisella kontrollilla, kanelialdehydillä, saadun lusiferaasiaktiivisuuden induktion pitäisi olla tilastollisesti merkitsevä 1,5:n rajan yläpuolella (esimerkiksi T-testiä käytettäessä) ainakin yhdellä testatulla pitoisuudella (4–64 µM).

Toiseksi $EC_{1,5}$-arvon pitäisi olla testauslaitoksen säännöllisesti päivitettävän historiallisen keskiarvon kahden keskihajonnan välissä (esimerkiksi 7–30 µM validointitietojen perusteella). Lisäksi kanelialdehydin osalta kolmen rinnakkaisnäytteen keskimääräisen induktion pitäisi olla 64 µM:ssä 2–8. Ellei jälkimmäinen peruste täyty, kanelialdehydin annos-vastesuhde pitäisi tarkistaa huolella ja testit voidaan hyväksyä vain, jos on annos-vastesuhde on selvä, niin että lusiferaasiaktiivisuuden induktio kasvaa positiivisen kontrollin pitoisuuksien kasvaessa.

Lisäksi negatiivisen kontrollin (liuotinkontrollin) eli dimetyylisulfoksidin luminesenssilukeman keskimääräisen variaatiokertoimen pitäisi olla alle 20 prosenttia jokaisessa toistossa, joka käsittää kuusi kuoppaa, joista kukin testataan kolmesti. Jos vaihtelevuus on suurempi, tulokset on hylättävä.

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

KeratinoSens™-ennuste katsotaan positiiviseksi, jos kaikki neljä seuraavaa ehtoa täyttyvät kahdessa toistossa kahdesta tai samoissa kahdessa toistossa kolmesta; muutoin KeratinoSens™-ennuste katsotaan negatiiviseksi (kuva 1):

1. I_{max} on yli (>) 1,5-kertainen ja poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi liuotinkontrollista (negatiivinen kontrolli) (siten kuin määritetty kaksisuuntaisessa parittomassa Studentin t-testissä)

2. solujen elinkykyisyys on yli (>) 70 prosenttia pienimmällä pitoisuudella, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktio on yli 1,5-kertainen (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaisevalla pitoisuudella)

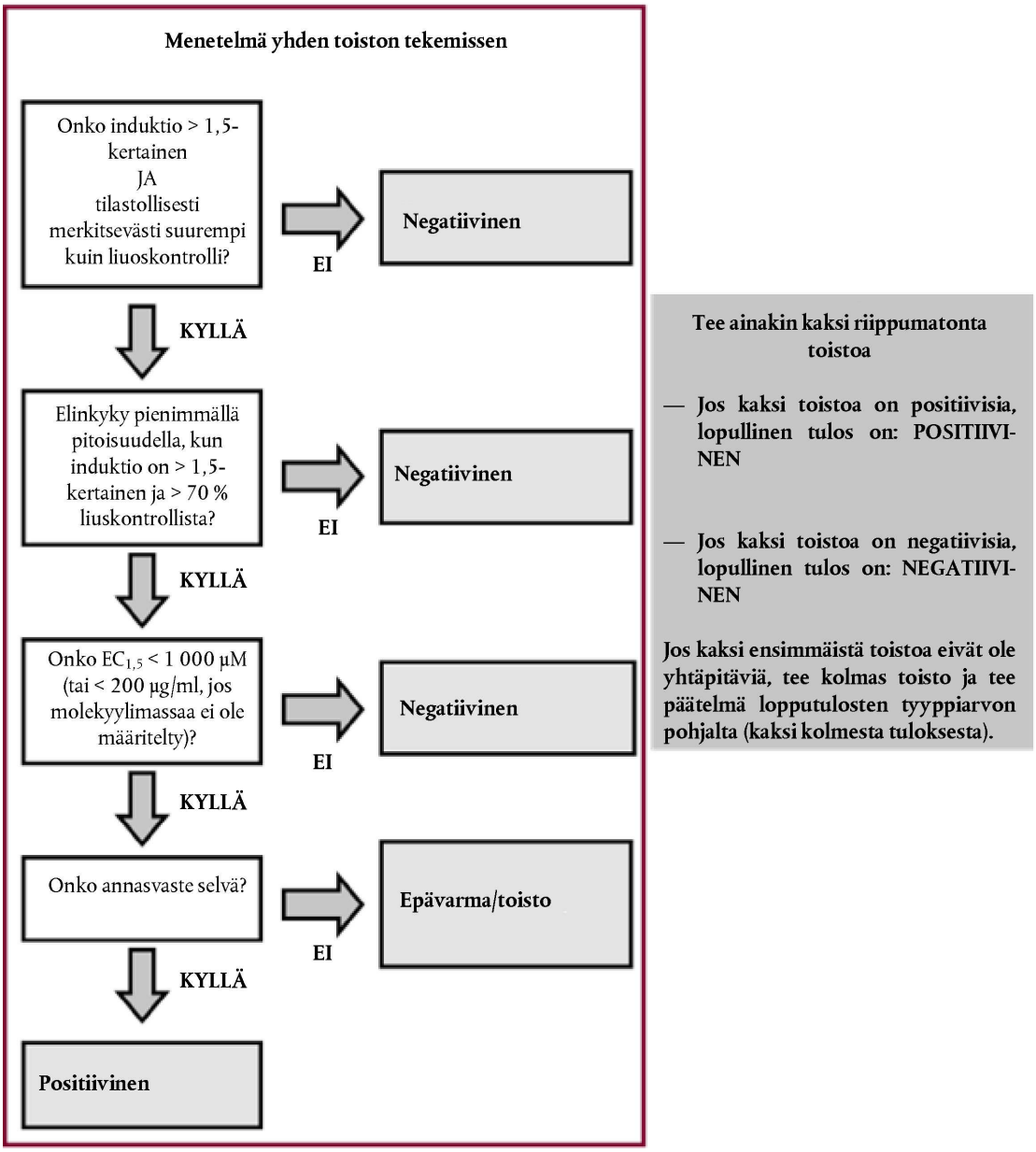
3. $EC_{1,5}$-arvo on alle (<) 1 000 µM (tai < 200 µg/ml, kun testikemikaalin molekyylimassaa ei ole määritetty)

4. lusiferaasi-induktiolla on ilmeinen yleinen annos-vastesuhde (tai kohdassa 33 mainittu bifaasinen vaste).

Jos tietyssä toistossa kaikki kolme ensimmäistä edellytystä täyttyvät, mutta lusiferaasi-induktion selvää annos-vastesuhdetta ei havaita, kyseisen toiston tulos pitäisi katsoa epävarmaksi ja testejä on mahdollisesti tehtävä lisää (kuva 1). Lisäksi negatiivinen tulos, joka on saatu pitoisuuksilla, jotka ovat alle 1 000 µM (tai alle 200 µg/ml, kun testikemikaalin molekyylimassaa ei ole määritetty), pitäisi myös katsoa epävarmaksi (ks. 11 kohta).

Kuva 1

KeratinoSens™-kokeessa käytetty ennustemalli. KeratinoSens™-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n valossa ja kohtien 9 ja 11 mukaisesti.



Harvoissa tapauksissa testikemikaalit, joiden indusoima lusiferaasiaktiivisuus on hyvin lähellä sytotoksisia tasoja, voivat olla positiivisia joissakin toistoissa ei-sytotoksisila tasoilla (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaiseva pitoisuus on pienempi kuin (<) IC_{30}), ja toisissa toistoissa vain sytotoksisilla tasoilla (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaiseva pitoisuus on suurempi kuin (>) IC_{30}). Tällaiset kemikaalit on testattava uudelleen käyttämällä kapeampaa annos-vasteanalyysia ja pienempää laimennuskerrointa (eli 1,33- tai Ö2 (= 1,41) -kertainen laimennus kuoppien välillä), jotta voidaan määrittää, onko induktio tapahtunut sytotoksisilla tasoilla vai ei (9).

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— Yhdestä aineosasta muodostuva aine

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— Monesta aineosasta muodostuva aine, koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine sekä seos:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja aineosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylimassa tai näennäinen molekyylimassa, kun kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Kontrollit

— Positiivinen kontrolli

— kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

— Negatiivinen (kantaja)kontrolli

— kemiallinen tunniste, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t) ja/tai muut tunnisteet

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kun kyse on muista kuin tässä testimenetelmässä mainituista negatiivisista kontrolleista/kantaja-aineista ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testimenetelmästä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— jatkoviljelyjen määrä ja testaamiseen käytettyjen solujen konfluenssiaste

— testaamista edeltävään siirrostukseen käytetty solujen laskentamenetelmä ja toimenpiteet, joilla on varmistettu solujen määrän tasainen jakautuminen (ks. 20 kohta)

— käytetty luminometri (esimerkiksi malli), mukaan lukien instrumenttiasetukset, käytetty lusiferaasisubstraatti sekä lisäyksessä 3 kuvattuun kontrollitestiin perustuvien asianmukaisten luminesenssimittausten esittely

— menettely, jolla on osoitettu laboratorion pätevyys suorittaa testimenetelmä (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen) tai osoitettu testimenetelmän toistettavuus ajan mittaan.

Testimenettely

— toistojen ja rinnakkaisnäytteiden määrä

— testikemikaalien pitoisuudet, aplikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimukselle asetetuista hyväksyttävyyskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— taulukkomuodossa kunkin toiston osalta testikemikaalille ja positiiviselle kontrollille saadut I_{max}-, $EC_{1,5}$- ja elinkykyarvot (IC_{50}, IC_{30}) sekä keskiarvot (I_{max}: keskiarvo; $EC_{1,5}$ ja elinkykyarvot: geometrinen keskiarvo) sekä keskihajonta, joka lasketaan kaikkien yksittäisten toistojen tiedoista, sekä tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin mukaisesti

— kunkin kokeen osalta negatiivisen kontrollin luminesenssilukemilla saatu variaatiokerroin

— kaavio, jossa kuvataan lusiferaasiaktiivisuuden induktion ja elinkyvyn annos-vastekäyrät

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— KeratinoSens™-kokeella saatujen tulosten tarkastelu

— testimenetelmällä saatujen tulosten tarkastelu IATA:n valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDENKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367–485.

(4) Tässä liitteessä oleva B.42 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(5) Tässä liitteessä oleva B.6 luku: Ihon herkistyminen.

(6) Tässä liitteessä oleva B.50 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(7) Tässä liitteessä oleva B.51 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: BrdU-ELISA -menetelmä.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284–292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281–90.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779–1791.

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45–49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In vitro* 25, 733–744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337–1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106–121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389–400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489–504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353–1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In vitro* 27, 1220–1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683–1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646–657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813–1822.

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301–316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225–2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 s. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, mukaan lukien tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimet, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (1).

ARE: Antioksidatiivinen vaste-elementti (josta käytetään myös nimitystä elektrofiilinen vaste-elementti, EpRE) on vaste-elementti, joka löytyy monien sytoprotektiivisten ja vaiheen II geenien ylävirrassa sijaitsevalta promoottorialueelta. Kun Nfr2 aktivoi sen, se välittää näiden geenien transkriptionaalisen induktion.

$EC_{1,5}$: 1,5-kertaiselle lusiferaasi-induktiolle interpoloitu pitoisuus.

Haittavaikutusreitti (Adverse Outcome Pathway, AOP): Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (2).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Herkkyydellä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta, ja se on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (29).

IC_{30}: Pitoisuus, joka vähentää solujen elinkykyä 30 prosenttia.

IC_{50}: Pitoisuus, joka vähentää solujen elinkykyä 50 prosenttia.

I_{max}: Suurin lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin verrattuna liuoskontrolliin (negatiiviseen kontrolliin) mitattuna millä tahansa testikemikaalipitoisuudella.

Keap1: Lyhenne sanoista *Kelch-like ECH-associated protein 1*. Sensoriproteiini, joka voi säädellä Nrf2-aktiivisuutta. Indusoimattomissa olosuhteissa Keap 1-sensoriproteiini vaikuttaa Nrf2-transkriptiofaktoriin ja saa aikaan ubikitinaation ja protelyyttisen degradaation proteasomissa. Keap 1:n reaktiivisten kysteiinijäämien kovalenttimuunnos pienten molekyylien vaikutuksesta voi johtaa Nrf2:n irtoamiseen Keap1:stä (8) (10) (11).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Liuotin-/kantajakontrolli: Rinnakkaisnäyte, joka sisältää kaikki testijärjestelmän komponentit lukuun ottamatta testikemikaalia ja mukaan lukien käytetyn liuottimen. Sen avulla määritetään perusvaste sellaisten näytteiden osalta, joita käsitellään samaan liuottimeen liuotetulla testikemikaalilla.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus (29).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (29).

Nrf2: Lyhenne sanoista *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*. Transkriptiofaktori, joka on osa antioksidatiivista vastereittiä. Kun Nrf2 ei ubikinoidu, se kertyy sytoplasmaan ja siirtyy tumaan, missä se yhdistyy ARE:hen monien sytoprotektiivisten geenien ylävirrassa sijaitsevalla promoottorialueella ja käynnistää niiden transkription (8) (10) (11).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta aineesta ja jossa nämä aineet eivät reagoi (1).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (29).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (29).

Testikemikaali: Termillä ”testikemikaali” viitataan siihen, mitä testataan.

Useasta aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta aineosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta aineosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta aineosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Uusittavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti tehdyillä testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (29).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (29).

Variaatiokerroin: Variaation mittayksikkö, joka lasketaan toistoista saatujen tietojen pohjalta jakamalla normaalijakauma keskiarvolla. Variaatiokerroin voidaan ilmaista prosenttilukuna kertomalla se 100:lla.

Yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin (Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Yhdestä aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

YK:n GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, Yhdistyneiden kansakuntien kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

In vitro -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmä

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla KeratinoSens™-kokeella oikea, odotettu ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla $EC_{1,5}$- ja IC_{50}-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaraan. Muita valintakriteerejä olivat kaupallinen saatavuus, laadukkaan *in vivo* -referenssin saatavuus sekä laadukkaiden *in vitro* -tietojen saatavuus KeratinoSens™-kokeesta.

Taulukko 1

Suositellut aineet KeratinoSens™-kokeen teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -ennuste (1)	KeratinoSens™ Ennuste (2)	$EC_{1,5}$ (µM) -viitealue (3)	IC_{50} (µM) -viitealue (3)
Isopropanoli	67-63-0	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Salisyylihappo	69-72-7	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Maitohappo	50-21-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Glyseroli	56-81-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Kinnamyylialkoholi	104-54-1	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	25–175	> 1 000
Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	5–125	> 500
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	25–250	> 500
Metyylidibromoglutaronitriili	35691-65-7	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	< 20	20–100
4-metyyliaminofenolisulfaatti	55-55-0	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	< 12,5	20–200
2,4-dinitrokloori-bentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (äärimmäisen)	Positiivinen	< 12,5	5–20

(1) Vaaraa (ja potenssia) koskevat ennusteet *in vivo* perustuvat LLNA-tietoihin (13). *In vivo* -potenssi on saatu käyttämällä ECETOC:n esittämiä kriteerejä (24).
(2) KeratinoSens™-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n ja tämän testimenetelmän kohtien 9 ja 11 määräysten valossa.
(3) Perustuu aiemmin havaittuihin arvoihin (12).

Lisäys 3

LUMINESENSSIMITTAUSTEN LAADUNVALVONTA

Peruskoe, jolla varmistetaan optimaaliset luminesenssimittaukset KeratinoSens™-kokeessa

Seuraavat kolme parametria ovat ratkaisevan tärkeitä varmistettaessa luminometrin tulosten luotettavuus:

— riittävä herkkyys, jolloin kontrollikuoppien antama tausta on tasainen

— ei gradienttia levyllä pitkän luenta-ajan vuoksi; ja

— se, etteivät erittäin aktiiviset kuopat aiheuta valokontaminaatiota viereisissä kuopissa.

Ennen testiä on suositeltavaa varmistaa luminesenssimittausten asianmukaisuus tekemällä testi seuraavassa kuvatulla kontrollilevykokoonpanolla (kolminkertainen analyysi).

Ensimmäisen harjoituskokeen levykokoonpano

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Tyhjä**

EGDMA = Etyleeniglykolidimetakrylaatti (CAS-nro 97-90-5), voimakkaasti indusoiva kemikaali

CA = Kanelialdehydi, positiivinen vertailuaine (CAS-nro 104-55-2)

Laadunvalvonta-analyysin pitäisi osoittaa seuraavaa:

— selvä annos-vastesuhde rivillä D, niin että I_{max} on yli 20 kertaa suurempi kuin tausta (useimmissa tapauksissa saavutetut I_{max}-arvot ovat 100–300)

— ei annos-vastesuhdetta riveillä C ja E (induktioarvo ei ole yli 1,5 (ihanteellisesti ei yli 1,3), mikä johtuu mahdollisesta valokontaminaatiosta, jota aiheuttavat erityisesti hyvin aktiiviset kuopat EGDMA-rivillä

— ei tilastollisesti merkitsevää eroa rivien A, B, C, E, F ja G välillä (eli ei gradienttia levyllä) ja

— riveillä A, B, C, E, F ja G ja H-rivin DMSO-kuopissa vaihtelun pitäisi olla alle 20 prosenttia (vakaa tausta).

B.61 **Fluoreseiinivuototestimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 460 (2012). Fluoreseiinivuototestimenetelmä (FL) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien (aineiden ja seosten) luokitteluun silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi aineiksi Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (luokka 1), aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) (luokka 1) ja Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (Environmental Protection Agency, EPA) (luokka I) (1) (2) määritelmien mukaisesti. Tässä testimenetelmässä silmää vakavasti ärsyttävillä aineilla tarkoitetaan testikemikaaleja, joiden annostelu silmään aiheuttaa kudosvaurioita, jotka eivät palaudu 21 päivässä, tai jotka aiheuttavat vakavaa fyysistä näön rappeutumista, ja silmää syövyttävillä aineilla tarkoitetaan kemikaaleja, jotka aiheuttavat silmään palautumatonta kudosvauriota. Nämä kemikaalit kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 ja EPA:n luokkaan I.

Vaikka fluoreseiinivuototestimenetelmää ei pidetäkään sopivana menetelmänä korvaamaan kokonaan kanin silmällä tehdyn *in vivo* -testin, sitä suositellaan käytettäväksi osana vaiheittaista testausstrategiaa sääntömääräistä luokittelua ja merkitsemistä varten. Siten fluoreseiinivuototestimenetelmää suositellaan ensimmäisen vaiheen menetelmäksi ylhäältä alaspäin etenevässä lähestymistavassa silmää syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, erityisesti tietynlaisten, tarkkaan rajattujen kemikaalien osalta (vesiliuokset aineet ja seokset). (3) (4).

Nykyään tunnustetaan yleisesti se, ettei yksikään *in vitro* -silmä-ärsytystesti voi korvata lähitulevaisuudessa *in vivo* -silmätestiä (TM B.5 5 (5)) keinona saada ennusteita koko ärsytysskaalasta eri kemikaaliluokkien osalta. *In vivo* -silmätesti saattaa kuitenkin olla mahdollista korvata useiden eri testimenetelmien strategisilla yhdistelmillä (vaiheittaisessa) testausstrategiassa (4). Ylhäältä alaspäin etenevä lähestymistapa (4) on suunniteltu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella kemikaalin ärsytyspotentiaalin oletetaan olevan suuri.

Kohdassa 35 esitetyn tarkan ennustemallin mukaisesti fluoreseiinitestimenetelmällä voidaan määrittää kemikaaleja rajalliselta sovellettavuusalueelta silmää syövyttäviksi aineiksi / silmää vakavasti ärsyttäviksi aineiksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka I) ilman jatkotestausta. Saman oletetaan koskevan seoksia, joskaan seoksia ei käytetty validoinnissa. Siksi fluoreseiinitestimenetelmää voidaan käyttää määrittämään kemikaalien ärsyttävyys/syövyttävyys silmässä testimenetelmän B.5 (5) vaiheittaisen testausstrategian mukaisesti. Kemikaali, jonka ei ole ennustettu syövyttävän tai ärsyttävän vakavasti silmää fluoreseiinitestimenetelmällä, on kuitenkin testattava yhdellä tai useammalla lisätestimenetelmällä (*in vitro*- ja/tai *in vivo* -menetelmällä), jolla voidaan tunnistaa täsmällisesti i) kemikaalit, jotka ovat *in vitro* vääriä negatiivisia silmää syövyttäviä / vakavasti ärsyttäviä aineita FL-menetelmässä (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka I); ii) kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmää syövyttäviksi/ärsyttäviksi (ei luokitusta YK:n GHS-järjestelmässä; ei luokitusta EU:n CLP-asetuksessa; EPA:n luokka IV); ja/tai iii) kemikaalit, joilla on kohtalainen/lievä silmää ärsyttävä vaikutus (YK:n GHS-järjestelmän luokat 2A ja 2B; EU:n CLP-asetuksen luokka 2; EPA:n luokat II ja III).

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla sen kykyä aiheuttaa vahinkoa läpäisemättömässä konfluentissa yksikerroksisessa epiteelisolukudoksessa. Epiteelikerroksen, kuten sidekalvon ja sarveiskalvon epiteelikerroksen, tärkeänä tehtävänä on valvoa epiteelin läpäisevyyttä. Epiteelin läpäisevyyttä hallitsevat monet tiiviit liitokset. Sarveiskalvon epiteelin läpäisevyyden kasvun *in vivo* on osoitettu korreloivan havaitun tulehduksen ja pintavaurion voimakkuuden kanssa silmän ärsytyksen kehittyessä.

Fluoreseiinitestimenetelmässä mitataan toksisia vaikutuksia lyhytaikaisen testikemikaalialtistuksen jälkeen sen pohjalta, miten natriumfluoreseiinin kyky päästä läpäisevien inserttien päällä viljellyistä Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) -soluista muodostuvan yhden solun vahvuisen epiteelikerroksen läpi kasvaa. Fluoreseiinivuodon määrä riippuu vauriosta, jonka kemikaali on aiheuttanut tiiviille liitoksille, desmosomiliitoksille ja solukalvoille, ja sen avulla voidaan arvioida testikemikaalin potentiaalista toksisuutta silmälle. Lisäyksessä 1 on kaavio fluoreseiinivuototestimenetelmää varten inserttikalvolla viljellyistä MDCK-soluista.

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

Määritelmät esitetään lisäyksessä 2.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu INVITTOX-testimenetelmäprotokollaan nro 71 (6), jota Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus (ECVAM) on arvioinut yhteistyössä Yhdysvaltojen vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojen välisen koordinointikomitean (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) ja Japanin vastaavan keskuksen (JaCVAM) kanssa.

Fluoreseiinivuototestimenetelmää ei suositella sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka pitäisi luokitella lievää tai kohtalaista ärsytystä aiheuttaviksi tai joita ei pitäisi luokitella silmä-ärsytyksen osalta (aineet ja seokset) (eli YK:n GHS-järjestelmän luokka 2A/2B, ei luokitusta; EU:n CLP-asetuksen luokka 2, ei luokitusta; EPA:n luokka II/III/IV), kuten validointitutkimuksessa on osoitettu (3) (7).

Testimenetelmä soveltuu vain vesiliukoisille kemikaaleille (aineille ja seoksille). Fluoreseiinivuototestimenetelmä ennustaa yleensä oikein kemikaalien vakavan silmä-ärsytyspotentiaalin, jos kemikaalit ovat vesiliukoisia ja/tai laimennuksella ei ole vaikutusta niiden toksiseen vaikutukseen (7). Jotta kemikaali voidaan luokitella vesiliukoiseksi, sen pitäisi koeolosuhteissa liueta steriiliin kalsiumpitoiseen (pitoisuus 1,0–1,8 mM), fenolipunaa sisältämättömään Hanksin suolaliuokseen (HBSS), niin että sen pitoisuus on vähintään 250 mg/ml (yksi annos yli rajan 100 mg/ml). Jos testikemikaali kuitenkin liukenee alle 100 mg:n/ml pitoisuutena mutta saa jo kyseisellä pitoisuudella aikaan 20 prosentin fluoreseiinivuodon (eli FL_{20} < 100 mg/ml), se voidaan silti luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 tai EPA:n luokkaan I.

Tämän testimenetelmän rajoituksena on se, ettei sitä voida käyttää vahvoihin happoihin ja emäksiin, solufiksatiiveihin ja erittäin haihtuviin kemikaaleihin. Näihin kemikaaleihin liittyy mekanismeja, joita fluoreseiinivuototestimenetelmä ei mittaa, esimerkiksi mittava koagulaatio, saippuoituminen tai erityisiä kemiallisia reaktioita. Muut menetelmän tunnetut rajoitteet perustuvat tuloksiin, jotka liittyvät menetelmän kykyyn antaa ennusteita värillisten ja viskoosisten testikemikaalien osalta (7). On esitetty, että kummankin tyyppisiä kemikaaleja on vaikeaa saada pois yhden solun vahvuisesta kerroksesta lyhyen altistusajan jälkeen ja että useamman pesuvaiheen käyttö parantaisi testimenetelmän ennustuskykyä. Nesteeseen liuotetuilla kiinteillä kemikaaleilla on taipumusta saostua, ja solujen altistuksessa käytettyä lopullista pitoisuutta on vaikeaa määrittää. Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat kemikaalit, fluoreseiinivuototestimenetelmän tarkkuus EU:n, EPA:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä paranee huomattavasti (7).

Tämän testimenetelmän tarkoituksen valossa (eli vain silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi) väärät negatiiviset tulokset (ks. 13 kohta) eivät ole ratkaisevia, sillä tällaiset kemikaalit testattaisiin tämän jälkeen muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai kaneilla sen mukaan, mitä sääntömääräiset vaatimukset edellyttävät, käyttäen vaiheittaista testistrategiaa todistusnäyttölähestymistavan mukaisesti (5) (ks. myös 3 ja 4 kohta).

Muut fluoreseiinivuototestimenetelmän tunnetut rajoitukset liittyvät vääriin negatiivisiin ja vääriin positiivisiin tuloksiin. Kun menetelmää käytetään ensimmäisenä vaiheena ylhäältä alaspäin etenevässä lähestymistavassa vesiliukoisten silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden ja seosten tunnistamiseksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka I), FL-testimenetelmän väärien positiivisten tulosten osuus vaihteli 7 prosentista (7/103; YK:n GHS ja EU:n CLP) 9 prosenttiin (9/99; Yhdysvaltojen EPA) ja väärien negatiivisten tulosten osuus vaihteli 54 prosentista (15/28; Yhdysvaltojen EPA) 56 prosenttiin (27/48; YK:n GHS ja EU:n CLP) verrattuna *in vivo* -tuloksiin. Kemikaaliryhmiä, jotka tuottivat vääriä positiivisia ja/tai vääriä negatiivisia tuloksia FL-testimenetelmässä, ei määritetä tässä.

MDCK-soluviljelmään liittyy tiettyjä teknisiä rajoitteita. Tiiviit liitokset, jotka estävät natriumfluoreseiiniväriaineen kulkeutumisen yhden solun vahvuisen kerroksen läpi, heikentyvät lukuisten jatkoviljelyjen myötä. Puutteet tiiviiden liitosten muodostumisessa johtavat siihen, että fluoreseiinivuoto lisääntyy käsittelemättömässä kontrollissa. Siksi on tärkeää määrittää suurin sallittu vuoto käsittelemättömissä kontrolleissa (ks. 38 kohta: vuoto 0 prosenttia). Koska solut voivat alkaa muuttua ajan mittaan, aivan kuten kaikkien *in vitro* -kokeidenkin tapauksessa, on tärkeää ilmoittaa, kuinka monetta jatkoviljelyä kokeissa käytetään.

Käyttöaluetta voidaan laajentaa nykyisestä joissakin tapauksissa, mutta vasta kun kattavampia tietoja tutkituista testikemikaaleista on analysoitu, ja nämä tiedot on mieluiten hankittava testaamalla (3). Tätä testimenetelmää päivitetään sen mukaisesti uusien tietojen tarkastelun myötä.

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 3 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratoriot voivat käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä FL-testin suorituksessa ennen kuin ne toimittavat FL-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

Fluoreseiinivuototestimenetelmä on sytotoksisuuteen ja solujen toimintaan perustuva *in vitro* -koe, jossa käytetään yhden solun vahvuista MDCK CB997 -lieriöepiteelisolujen konfluenttia viljelmää, joka on kasvatettu puoliläpäisevälle insertille ja joka mallintaa sarveiskalvon epiteelin proliferoitumatonta tilaa *in vivo*. MDCK-solulinja on vakiintunut käyttöön, ja solut muodostavat samanlaisia tiiviitä liitoksia ja desmosomiliitoksia kuin sidekalvon ja sarveiskalvon epiteelin apikaalisella puolella. Tiiviit liitokset ja desmosomiliitokset estävät *in vivo* liuenneita aineita ja vierasaineksia tunkeutumasta sarveiskalvon epiteelin läpi. Epiteelikudoksen muodostaman esteen menetys tiiviiden liitosten ja desmosomiliitosten vaurioitumisen vuoksi on yksi kemikaalin aiheuttamaan silmä-ärsytykseen johtavista varhaisista tapahtumista.

Testikemikaalia annostellaan insertin apikaalipuolelle kasvatetulle konfluentille solukerrokselle. Testissä käytetään rutiininomaisesti lyhyttä, yhden minuutin pituista altistusta, joka vastaa normaalia puhdistusvauhtia tilanteissa, joissa ihminen altistuu kemikaalille. Lyhyen altistusajan etuna on se, että vesipohjaisia aineita ja seoksia voidaan testata laimentamattomina, jos ne voidaan poistaa helposti altistuksen jälkeen. Tämän seurauksena tulokset ovat suoremmin verrattavissa kemikaalin vaikutuksiin ihmisissä. Tämän jälkeen testikemikaali poistetaan ja yhden solun vahvuiselle kerrokselle annostellaan myrkytöntä, erittäin fluoresenttia natriumfluoreseiiniväriainetta 30 minuutiksi. Vahinko, jonka testikemikaali aiheuttaa tiiviille liitoksille, määritetään sen perusteella, minkä verran fluoreseiinia vuotaa solukerroksen läpi tietyn ajan kuluessa.

Natriumfluoreseiiniväriaineen määrä, joka vuotaa yhden solun vahvuisen kerroksen ja inserttikalvon läpi kuopassa olevaan tiettyyn liuosmäärään (johon natriumfluoreseiiniväriaine päätyy), määritetään mittaamalla kuopan fluoreseiinipitoisuus spektrofluorometrialla. Fluoreseiinivuodon (FL) määrä lasketaan vertaamalla fluoresenssin intensiteetistä (FI) kertovia lukemia, jotka on saatu kahdesta kontrollista: nollakontrollista ja maksimaalista vuotoa kuvaavasta kontrollista. Vuotoprosentti ja siten tiiviiden liitosten vaurioitumisen aste ilmaistaan suhteessa näihin kontrolleihin kunkin määritetyn testikemikaalipitoisuuden osalta. Sitten lasketaan FL_{20} (eli pitoisuus, joka aiheuttaa 20 prosentin fluoreseiinivuodon suhteessa käsittelemättömän, konfluentin, yhden solun vahvuisen kerroksen ja soluttomien inserttien osalta kirjattuun arvoon). FL_{20}-arvoa (mg/ml) käytetään ennustemallissa silmää syövyttävien ja vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseen (ks. 35 kohta).

Palautuminen on tärkeä osa testikemikaalin toksisuusprofiilia, ja myös sitä arvioidaan *in vivo* -silmä-ärsytystestillä. Alustavien analyysien mukaan palautumistiedot (aina 72 tunnin jälkeen kemikaalialtistuksesta) voivat mahdollisesti lisätä INVITTOX-protokollan nro 71 ennusteentekoedellytyksiä, mutta lisäarvioita tarvitaan ja niissä olisi hyötyä lisätiedoista, jotka on mieluiten hankittu lisätesteillä (6). Tätä testimenetelmää päivitetään sen mukaisesti uusien tietojen tarkastelun myötä.

MENETTELY

Yhden solun vahvuisen kerroksen valmistelu

Yhden solun vahvuinen MDCK CB997 -solukerros valmistellaan käyttämällä ei-konfluentteja soluja, jotka kasvavat soluviljelypulloissa DMEM:ssä / Nutrient Mix F12 -seoksessa (1 x L-glutamiinipitoista konsentraattia, 15 mM HEPES-puskuria, kalsiumia (pitoisuus 1,0–1,8 mM) ja 10 prosenttia lämmöllä inaktivoitua FCS:ää/FBS:ää). On tärkeää, että kaikki aineet/liuokset, joita käytetään koko FL-kokeen ajan, sisältävät kalsiumia (jonka pitoisuus on 1,8 mM:n (200 mg/l) ja 1,0 mM:n (111 mg/l) välillä), mikä takaa kestävien tiiviiden liitosten muodostumisen. Tasaisten ja toistettavien tiiviiden liitosten muodostumisen varmistamiseksi on valvottava sitä, kuinka monennesta jatkoviljelystä peräisin olevia soluja käytetään (jatkoviljelyluku). Solujen jatkoviljelyluvun pitäisi mieluiten olla 3–30 sulatuksesta, sillä näistä jatkoviljelyeristä saadut solut toimivat samankaltaisesti, mikä myötävaikuttaa koetulosten toistettavuuteen.

Ennen fluoreseiinivuototestiä solut irrotetaan pullosta trypsinisaatiolla ja sentrifugoidaan ja sopiva määrä soluja siirrostetaan insertteihin, jotka on pantu 24-kuoppaisiin levyihin (ks. lisäys 1). Solujen siirrostamiseen pitäisi käyttää inserttejä, joiden halkaisija on 12 mm ja joissa on selluloosaesteriseoksesta muodostuva kalvo, jonka paksuus on 80–150 µm ja huokoskoko 0,45 mm. Validointitutkimuksessa käytettiin 12 mm:n Millicell-HA-inserttejä. Insertin ja kalvotyypin ominaisuudet ovat tärkeitä, sillä ne voivat vaikuttaa solujen kasvuun ja kemikaalin sitoutumiseen. Tietyntyyppiset kemikaalit voivat sitoutua Millicell-HA-inserttikalvoon, mikä voi vaikuttaa tulosten tulkintaan. Muita kalvoja käytettäessä niiden vastaavuus on osoitettava käyttämällä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja (ks. lisäys 3).

Kemikaalien sitoutuminen inserttikalvoon on tavallisempaa, kun kyseessä on kationinen kemikaali, kuten bentsalkoniumkloridi, joka jota varautunut kalvo vetää puoleensa (7). Kemikaalin sitoutuminen inserttikalvoon saattaa pidentää altistumisaikaa kemikaalille, mikä johtaa kemikaalin toksisen potentiaalin yliarviointiin, mutta voi myös fyysisesti vähentää fluoreseiinin vuotoa insertin läpi sitomalla väriainetta inserttikalvoon sitoutuneeseen kationiseen kemikaaliin, mikä johtaa kemikaalin toksisen potentiaalin aliarviointiin. Tätä on helppo seurata altistamalla pelkkä kalvo testattavan kemikaalin huippupitoisuudelle ja lisäämällä sitten natriumfluoreseiiniväriainetta normaali pitoisuus vakioajaksi (ei solukontrollia). Jos natriumfluoreseiiniväriainetta sitoutuu inserttikalvoon, se näyttää keltaiselta, kun testiaine on pesty pois. Siksi on olennaista tuntea testikemikaalin sitoutumisominaisuudet, jotta kemikaalin vaikutusta soluihin voidaan tulkita.

Insertteihin siirrostettujen solujen pitäisi muodostaa konfluentti yhden solun vahvuinen kerros, kun solut altistetaan kemikaalille. Kuhunkin inserttiin pitäisi lisätä $1{,}6 \times 10^5$ solua (400 µl solususpensiota, jossa on 4×10^5 solua millilitrassa). Näissä olosuhteissa konfluentti yhden solun vahvuinen kerros syntyy yleensä 96 tunnin viljelyn jälkeen. Insertit pitäisi tutkia silmämääräisesti ennen siirrostusta, jotta varmistetaan, että kohdan 30 mukaisessa silmämääräisessä tarkastuksessa mahdollisesti kirjatut vauriot johtuvat käsittelystä.

MDCK-soluviljelmiä pitäisi pitää inkubaattoreissa kosteutetussa ympäristössä, jossa on 5 ± 1 prosentti CO_2:ta, ja 37 ± 1 °C:n lämpötilassa. Soluissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

Kutakin koeajoa varten on valmistettava tuore testikemikaalin kantaliuos, ja se on käytettävä 30 minuutin kuluessa valmistuksesta. Seerumin proteiinien sitoutumisen välttämiseksi testikemikaalien valmistelussa on käytettävä kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunatonta HBSS:ää. Ennen testaamista on arvioitava, miten 250 mg kemikaalia liukenee millilitraan HBSS:ää. Jos kemikaali pysyy tällä pitoisuudella vakaana suspensiona tai emulsiona (eli jos se säilyy tasaisena eikä saostu tai jakaudu useampaan faasiin) 30 minuutin jälkeen, HBSS:ää voidaan käyttää edelleen liuottimena. Jos kuitenkin havaitaan, ettei kemikaali liukene tällaisena pitoisuutena HBSS:ään, on harkittava muiden testimenetelmien käyttämistä fluoreseiinivuotomenetelmän sijaan. Tilanteissa, joissa kemikaali ei liukene HBSS:ään, kevyen mineraaliöljyn käyttöä liuottimena pitäisi harkita varoen, sillä saatavana ei ole riittävästi tietoja, joiden pohjalta voitaisiin tehdä päätelmiä fluoreseiinivuotokokeen suorituskyvystä tällaisissa olosuhteissa.

Kaikkien testattavien kemikaalien valmistelussa käytetään steriiliä kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunatonta HBSS:ää, ja kantaliuoksesta valmistetaan viisi pitoisuutta liuottamalla tietty massa tiettyyn tilavuuteen – 1, 25, 100 ja 250 milligrammaa yhteen millilitraan sekä yksi raaka tai tyydyttynyt liuos. Kiinteää kemikaalia testattaessa mukana pitäisi olla yksi liuos, jossa pitoisuus on erittäin suuri, 750 mg/ml. Tämän kemikaalipitoisuuden annostelussa soluille on mahdollisesti käytettävä positive displacement -pipettiä. Jos toksisen pitoisuuden havaitaan olevan 25–100 mg/ml, on testattava kahdesti seuraavat ylimääräiset pitoisuudet: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20}-arvo pitäisi johtaa näistä pitoisuuksista sillä edellytyksellä, että hyväksyttävyysperusteet täyttyvät.

Testikemikaaleja annostellaan konfluentille yhden solun vahvuiselle kerrokselle soluviljelynesteen poistamisen jälkeen ja pestään steriilillä, lämpimällä (37 °C), kalsiumpitoisella (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunattomalla HBSS:llä. Tätä ennen tarkastetaan silmämääräisesti, ettei suodattimissa ole ennalta vaurioita, jotka voisivat virheellisesti aiheuttaa mahdollisia yhteensopimattomuuksia testikemikaalien kanssa. Kussakin ajossa kutakin testikemikaalipitoisuutta ja kontrollia kohden pitäisi käyttää ainakin kolmea rinnakkaisnäytettä. Kun altistus huoneenlämmössä on kestänyt yhden minuutin, testikemikaali imetään huolellisesti pois, yhden solun vahvuinen kerros pestään steriilillä, lämpimällä (37 °C), kalsiumpitoisella (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunattomalla HBSS:llä ja fluoreseiinivuoto mitataan välittömästi.

Kussakin ajossa olisi käytettävä rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja (NC) ja positiivisia kontrolleja (PC) osoittamaan, että yhden solun vahvuisen kerroksen eheys (negatiivinen kontrolli) ja solujen herkkyys (positiivinen kontrolli) ovat määritellyn aikaisemman hyväksyttävyysvälin sisällä. Positiivisen kontrollin kemikaaliksi ehdotetaan Brij 35:tä (CAS-nro 9002-92-0), niin että pitoisuus on 100 mg/ml. Tämän pitoisuuden pitäisi saada aikaan noin 30 prosentin fluoreseiinivuoto (hyväksyttävyysväli on 20–40 prosentin fluoreseiinivuoto eli vaurio solukerroksessa). Negatiivisen kontrollin kemikaaliksi ehdotetaan kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM), fenolipunatonta HBSS:ää (käsittelemätön nollakontrolli). Kunkin ajon pitäisi sisältää myös enimmäisvuotokontrolli, jotta FL_{20}-arvot voidaan laskea. Enimmäisvuoto määritetään käyttämällä kontrolli-inserttiä ilman soluja.

Fluoreseiinin läpäisevyyden määrittäminen

Heti kun testi- ja kontrollikemikaalit on poistettu, insertteihin lisätään 400 µl natriumfluoreseiiniliuosta, jonka pitoisuus on 0,1 mg/ml (0,01 painoprosenttia tilavuudesta kalsiumpitoisessa [pitoisuus 1,0–1,8 mM] fenolipunattomassa HBSS:ssä) (esimerkiksi Millicell-HA). Viljelmiä pidetään 30 minuuttia huoneenlämmössä. Kun inkubaatio fluoreseiinin kanssa päättyy, insertit poistetaan huolellisesti kustakin kuopasta. Kukin suodatin tarkistetaan silmämääräisesti, ja käsittelyn aikana mahdollisesti syntyneet vauriot kirjataan.

Yhden solun vahvuisen kerroksen ja insertin läpi vuotaneen fluoreseiinin määrä kvantifioidaan liuoksesta, joka jää kuoppiin inserttien poistamisen jälkeen. Mittaukset tehdään spektrofluorometerillä, niin että eksitaatioaallonpituus on 485 nm ja emissioaallonpituus 530 nm. Spektrofluorometrin herkkyys pitäisi asettaa sellaiseksi, että suurimman fluoreseiinivuodon (insertti ilman soluja) ja pienimmän fluoreseiinivuodon (insertti, jossa on negatiivisella kontrollilla käsitelty konfluentti yhden solun vahvuinen kerros) välinen numeerinen ero on mahdollisimman suuri. Käytettyjen spektrofluorometrien erojen vuoksi ehdotetaan käytettäväksi herkkyyttä, jolla fluoresenssin intensiteetti on yli 4 000 suurimman fluoreseiinivuotokontrollin osalta. Suurin fluoreseiinivuotoarvo ei saa olla yli 9 999. Fluoreseiinivuodon suurimman intensiteetin pitäisi olla käytetyn spektrofluorometrin lineaarisella vaihtelualueella.

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

Fluoreseiinivuodon määrä riippuu siitä, minkä verran kemikaali on vahingoittanut tiiviitä liitoksia. Kunkin testatun kemikaalipitoisuuden aiheuttaman fluoreseiinivuodon prosentuaalinen aste lasketaan kyseisen testikemikaalin fluoreseiinivuotoarvoista vertaamalla niitä negatiivisen kontrollin fluoreseiinivuotoarvoihin (negatiivisella kontrollilla käsitellystä konfluentista yhden solun vahvuisesta kerroksesta saatu lukema) ja enimmäisvuorokontrollin fluoreseiinivuotoarvoihin (soluttoman insertin läpi vuotaneen fluoreseiinin määrästä kertova lukema).

Enimmäisvuodon fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti = x

0 prosentin vuodon fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti (NC) = y

100 prosentin vuodon keskiarvo saadaan vähentämällä keskimääräinen 0 prosentin vuoto keskimääräisestä enimmäisvuodosta

eli kaavalla $x - y = z$.

Kunkin tietyn annoksen vuotoprosentti lasketaan vähentämällä 0 prosentin vuoto kolmen rinnakkaisnäytteen fluoresenssin keskimääräisestä intensiteetistä (m) ja jakamalla tämä arvo 100 prosentin vuodolla, toisin sanoen kaavalla % FL = [(m–y) / z] × 100 %, jossa

m = tietyn pitoisuuden kolmen rinnakkaisnäytteen fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti

% FL = solukerroksen läpi vuotaneen fluoreseiinin prosentuaalinen määrä.

Kemikaalipitoisuus, joka aiheuttaa 20 prosentin fluoreseiinivuodon, on laskettava seuraavalla kaavalla:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

jossa

D = inhibitioaste (%)

A = vaurioaste (%) (20 prosentin fluoreseiinivuoto)

B = fluoreseiinin vuotoaste (%) < A

C = fluoreseiinin vuotoaste (%) > A

M_C = C:n pitoisuus (mg/ml)

M_B = B:n pitoisuus (mg/ml)

FL_{20}:n raja-arvo sen ennustamiselle, ovatko kemikaalit silmää syövyttäviä / vakavasti ärsyttäviä, esitetään seuraavassa:

FL_{20} (mg/ml)	YK:n GHS (luokitus ja merkitseminen)	EU:n CLP (luokitus ja merkitseminen)	Yhdysvaltojen EPA (luokitus ja merkitseminen)
≤ 100	Luokka 1	Luokka 1	Luokka I
Luokitus ja merkitseminen (C & L)			

Fluoreseiinitestimenetelmää suositellaan vain vesiliukoisten silmää syövyttävien ja vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1, EU:n CLP-asetuksen luokka 1, Yhdysvaltojen EPA:n luokka I) (ks. 1 ja 10 kohta).

Jotta vesiliukoisten kemikaalien (aineiden ja seosten) (3) (6) (7) voidaan katsoa aiheuttavan ”vakavaa vahinkoa silmälle” (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokka 1) tai olevan ”silmää syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä” (Yhdysvaltojen EPA:n luokka I), testikemikaalin pitäisi tuottaa FL_{20}-arvo enintään 100 mg:n/ml pitoisuudella.

Tulosten hyväksyminen

Suurimman keskimääräisen fluoreseiinivuotoarvon (x) pitäisi olla yli 4 000 (ks. 31 kohta), 0 prosentin vuodon keskiarvon (y) pitäisi olla enintään 300, ja 100 prosentin vuodon keskiarvon (z) pitäisi olla 3 700–6 000.

Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivinen kontrolli on aiheuttanut 20–40 prosentin vaurion solukerrokselle (mitattuna prosentuaalisena fluoreseiinivuotona).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

Yksittäisten rinnakkaisnäytekuoppien tiedot pitäisi esittää kunkin ajon osalta taulukkomuodossa (esimerkiksi fluoresensin intensiteetin arvot ja lasketun prosentuaalisen fluoreseiinivuodon tiedot kunkin testikemikaalin osalta, luokitus mukaan luettuna). Lisäksi on raportoitava kunkin ajon yksittäisten rinnakkaisnäytemittausten keskiarvot ± keskihajonta.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (kemialliset nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan

— kemikaalin CAS-numero, jos tieto on saatavilla

— aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— tutkimuksen suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (kuten fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH-arvo, stabiilius, vesiliukoisuus, kemiallinen luokka)

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— varastointiolosuhteet.

Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu

— Pitäisi sisältää näkökohtia, jotka koskevat testimenetelmän soveltamisalaa ja rajoituksia.

Testiolosuhteet

— käytetyn solujärjestelmän kuvaus, mukaan lukien todistus autenttisuudesta ja solulinjan mykoplasmastatuksesta

— käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti

— Käytetyt testikemikaalikonsenraatiot

— altistumisaika testikemikaalille

— fluoreseiinin kanssa tehdyn inkubaation kesto

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä

— viittaukset mallin historiatietoihin (tarvittaessa esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, vertailukemikaalit)

— tieto laboratorion osoittamasta teknisestä pätevyydestä.

Tulokset

— kunkin ajon ja kunkin rinnakkaismittauksen osalta taulukkomuotoiset tulokset yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolleista (mukaan lukien yksittäiset tulokset, keskiarvot ja keskihajonnat)

— tulosten perusteella tehty luokitus (tehdyt luokitukset) ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekokriteereistä

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu

— Tulosten tarkastelussa pitäisi käsitellä myös näkökohtia, jotka liittyvät siihen, ettei vakuuttavaa tulosta ole saatu (kohta 35: FL_{20} > 100 mg/ml), sekä lisätestaukseen.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In vitro* 24, 1-9

(5) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

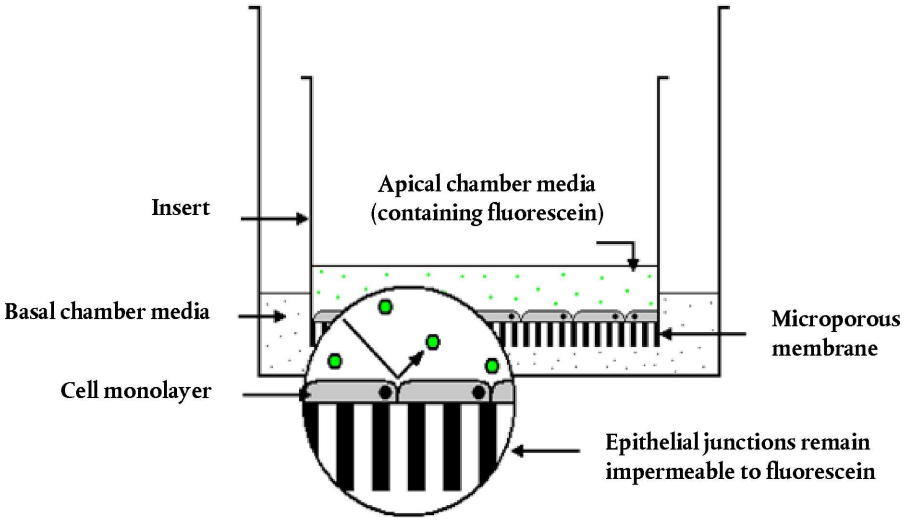
(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

Lisäys 1

KAAVIO INSERTTIKALVOLLA FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄÄ VARTEN KASVATETUISTA MDCK-SOLUISTA

Insertin puoliläpäisevälle kalvolle kasvatetaan konfluentti MDCK-solukerros. Insertit asetetaan 24-kuoppaisten levyjen kuoppiin.



Kuvan lähde: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT

Aine: Tarkoittaa YK:n GHS-järjestelmässä alkuaineita ja niiden yhdisteitä sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, jotka sisältävät kaikki pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja tuotantotoiminnassa muodostuvat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

EPA:n luokka 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (2).

EU:n CLP-asetu: (asetus (EY) N:o 1272/2008 aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta): Asetus, jolla kemikaalien (aineiden ja seosten) luokittelua ja merkintöjä koskeva YK:n GHS-järjestelmä saatetaan osaksi Euroopan unionin (EU) lainsäädäntöä.

FL_{20}: Arvioitavissa määrittämällä pitoisuus, jolla testattu kemikaali aiheuttaa 20-prosenttisen fluoreseiinivuodon solukerroksen läpi.

Fluoreseiinivuoto: Spektrofluorometrilla mitattu solukerroksen läpi kulkeneen fluoreseiinin määrä.

GHS (Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi.

GHS:n luokka 1: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (8).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä.

Liuotin-/kantajakontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luokittelematon: Kemikaali, jota ei ole luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, 2A tai 2B, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I, II, tai III kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (8).

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Positiivinen vaste ei saisi olla äärimmäinen, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelua ajan funktiona voidaan arvioida.

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit: Vertailukemikaalien listalla oleva alaryhmä, jonka avulla kokematon laboratorio voi osoittaa pätevyytensä validoidun vertailutestimenetelmän käyttöön.

Seos: YK:n GHS-järjestelmän yhteydessä tarkoitettu seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta keskenään reagoimattomasta aineesta.

Silmää syövyttävä aine: (a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota. (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: (a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota. (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää ärsyttävä aine: (a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2A tai 2B, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 2 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan II tai III kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta, ja se on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä.

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää kemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaali ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (8).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Niiden negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Lisäys 3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄSSÄ

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen pitäisi osoittaa tekninen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen kahdeksan aineen silmäsyövyttävyysluokitus. Nämä kemikaalit on valittu siten, että ne edustavat kattavasti erilaisia vasteita silmän paikalliselle ärsytykselle/syövytykselle, ja nämä puolestaan perustuvat kanin silmällä tehtyyn *in vivo* -testiin (TG 405, TM B.5(5)) (eli luokat 1, 2A, 2B tai ei luokitusta YK:n GSH-järjestelmässä). Fluoreseiinivuotokokeen validoidun käyttökelpoisuuden kannalta (eli vain silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistaminen) pätevyyden osoittamiseksi tarkoitettuun luokitukseen sopivia testituloksia on vain kaksi (syövyttävä / vakavasti ärsyttävä tai ei-syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä). Muita valintakriteerejä olivat se, että kemikaaleja on kaupallisesti saatavana, se, että saatavana on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja, ja se, että fluoreseiinitestimenetelmästä on laadukasta tietoa. Tästä syystä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit valittiin asiakirjasta "Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), jota käytettiin fluoreseiinivuototestimenetelmän takautuvaan validointiin.

Taulukko 1

Suositellut kemikaalit FL-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Prometatsiinihydrokloridi	58-33-3	Amiini/amidiini, heterosyklinen, orgaaninen rikkiyhdiste	Kiinteä	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Natriumhydroksidi (10 %)	1310-73-2	Emäs	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Natriumlauryylisulfaatti (15 %)	151-21-3	Karboksyylihappo (suola)	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
4-karboksibentsaldehydi	619-66-9	Karboksyylihappo, aldehydi	Kiinteä	Luokka 2(A)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2(A)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Nestemäinen	Luokka 2(B)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Nestemäinen	Ei luokitusta	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-numero = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (OECD TG 405, TM B.5) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää ja EU:n CLP-asetusta.

(3) Perustuu fluoreseiinivuotomenetelmällä saatuihin tuloksiin (INVITTOX-protokolla nro 71(6)).

B.62 **Nisäkkäiden emäksinen *in vivo* -komeettakoe**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 489 (2016). Emäksistä *in vivo* -komeettakoetta ('Comet-koe', jäljempänä 'komeettakoe', eli yhden solun geelielektroforeesi) käytetään DNA-säikeen katkeamien havaitsemiseen soluissa tai tumissa, jotka on eristetty potentiaalisesti genotoksiselle materiaalille / genotoksisille materiaaleille altistettujen eläinten, useimmiten jyrsijöiden, erilaisista kudoksista. Monet asiantuntijaryhmät ovat arvioineet komeettakoetta ja julkaisseet suosituksia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Komeettakokeen tarkoituksena on tunnistaa DNA-vaurioita aiheuttavia kemikaaleja. Komeettakokeella voidaan havaita emäksisissä olosuhteissa (pH > 13) yhden ja kahden säikeen katkeamia, jotka johtuvat esimerkiksi suorasta vuorovaikutuksesta DNA:n kanssa, emäksen labiileista kohdista tai DNA:n korjauksesta johtuvista väliaikaisista DNA-säikeen katkeamista. Nämä säikeiden katkeamat voivat korjaantua ilman pysyviä vaikutuksia, ne voivat johtaa solun kuolemaan tai ne voivat korjaantua mutaatiossa, joka johtaa pysyvään elinkykyiseen muutokseen. Ne voivat myös johtaa kromosomimuutokseen, joka yhteydessä myös moniin ihmisen sairauksiin, kuten syöpään.

Jyrsijöiden *in vivo* -komeettakokeen muodollinen validointikoe tehtiin 2006–2012, ja sitä koordinoi JaCVAM (Japanin vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus) yhdessä ECVAM:n (vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalaisen validointikeskuksen), ICCVAM:n (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälisen koordinointikomitean) ja NICEATM:n (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) kanssa (12). Testimenetelmän kuvaus sisältää komeettakokeen käyttöä koskevat suositukset ja rajoitukset ja perustuu validointikokeessa käytettyyn lopulliseen protokollaan (12) sekä muihin olennaisiin julkaistuihin ja julkaisemattomiin (laboratorioiden tekijänoikeuksien alaisiin) tietoihin.

Keskeisten termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1. Todettakoon, että tässä kokeessa voidaan käyttää monenlaisia alustoja (mikroskoopin näytelaseja, geelipisaroita, 96-kuoppaisia levyjä jne.) Käytännöllisyyden vuoksi koko tekstissä käytetään jäljempänä ilmaisua "näytelasi", mutta sillä tarkoitetaan myös kaikkia muita alustoja.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Komeettakoe on menetelmä, jolla mitataan DNA-säikeen katkeamia eukaryoottisoluissa. Agaroosiin upotetuille yksittäisille soluille/tumille tehdään lyysis, jossa käytetään puhdistusainetta ja jossa suolapitoisuus on korkea. Lyysisvaiheessa solun ja tuman kalvot sulavat, mikä mahdollistaa kierteisten DNA-ketjujen vapautumisen; näitä kutsutaan yleisesti nukleoideiksi ja DNA-fragmenteiksi. Kun elektroforeesi tehdään korkeassa pH:ssa, syntyy komeettaa muistuttavia rakenteita, jotka voidaan havaita voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla, käyttämällä sopivia fluoresoivia väriaineita; DNA-fragmentit siirtyvät niiden koosta riippuen komeetan "ytimestä" sen "pyrstöön", ja se, kuinka suuri komeetan pyrstö on suhteessa koko komeetan kokoon (ydin ja pyrstö), kertoo DNA:n hajoamisen asteesta (13) (14) (15).

Emäksinen *in vivo* -komeettakoe soveltuu erityisen hyvin genotoksisen vaaran arviointiin, sillä kokeessa vasteet riippuvat ADME-prosessista *in vivo* (*absorption*, *distribution*, *metabolism* and *excretion* eli absorptio, leviäminen, metabolismi ja eritys) ja myös DNA:n korjaantumisprosesseista. Nämä voivat vaihdella lajien, kudosten ja DNA-vaurion tyypin mukaan.

Eläinten hyvinvointia ja erityisesti eläinten käytön vähentämistä koskevien vaatimusten täyttämiseksi (noudattaen 3R-periaatetta – *replacement*, *reduction*, *refinement* eli korvaaminen, vähentäminen ja parantaminen) tämä koe voidaan yhdistää myös muihin toksikologisiin tutkimuksiin, esimerkiksi toistuvan annoksen toksisuutta koskeviin tutkimuksiin (10) (16) (17), tai päätetapahtuma voidaan yhdistää muihin genotoksisuuden päätetapahtumiin, esimerkkinä nisäkkäiden erytrosyyttimikrotumatesti *in vivo* (18) (19) (20). Komeettakokeessa käytetään useimmiten jyrsijöitä, joskin siihen on käytetty myös muita eläinlajeja, nisäkkäitä ja muita kuin nisäkkäitä. Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttö on perusteltava tieteellisesti ja eettisesti tapauskohtaisesti, ja vahvana suosituksena on, että komeettakokeessa käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä vain, jos koetta ei tehdä ainoana kokeena vaan se tehdään osana toista toksisuuskoetta.

Altistamisreittiä ja tutkittavaa altistettavaa kudosta / tutkittavia altistettavia kudoksia valittaessa päätöksenteon tulisi perustua kaikkeen saatavana/olemassa olevaan tietoon testikemikaaleista; tällaisia tietoja ovat esimerkiksi ihmisen suunniteltu/odotettava altistumisreitti, metabolismi ja leviäminen, potentiaaliset vaikutukset kosketuspaikassa, hälyttävät rakenteelliset seikat, muut genotoksisuus- tai toksisuustiedot sekä tutkimuksen tarkoitus. Siispä testikemikaalien genotoksisuuspotentiaalia voidaan arvioida soveltuvin osin kohdekudoksessa/-kudoksissa ilmenevien karsinogeenisten ja/tai muiden toksisten vaikutusten perusteella. Koetta pidetään hyödyllisenä myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena. Tutkimuksen kohteena olevalle kudokselle on sopivaa tehdä *in vivo* -komeettakoe, kun voidaan kohtuudella odottaa, että tutkimuksen kohteena oleva kudos on asianmukaisen altistuksen kohteena.

Kattavin validointi kokeelle on tehty käyttämällä urosrottien somaattisia kudoksia yhteistyötutkimuksissa, esimerkiksi JaCVAM (12) ja Rothfuss *et al.*, 2010 (10). JaCVAMin kansainvälisessä validointitutkimuksessa käytetiin maksaa ja mahalaukkua. Maksaa käytettiin siksi, että se on aktiivisin elin kemikaalien metabolismissa ja usein myös karsinogeenisten vaikutusten kohteena. Mahalaukkua käytettiin siksi, että se on yleensä ensimmäinen elin, jonka kanssa kemikaalit päätyvät kosketuksiin suun kautta tapahtuvan altistuksen jälkeen, joskin ruoansulatuskanavan muut alueet, kuten pohjukaissuoli (duodenum) ja tyhjäsuoli (jejunum), pitäisi myös lukea kemikaalin kanssa kosketuksiin joutuviksi kudoksiksi ja niillä voi olla ihmisten kohdalla olennaisempi merkitys kuin jyrsijän rauhasmahalla. On pidettävä huolta siitä, etteivät nämä kudokset altistu liian suurille testikemikaalipitoisuuksille (21). Menetelmää voidaan periaatteessa soveltaa mihin tahansa kudokseen, josta saadaan analysoitavia yhden solun/tuman suspensioita. Monien laboratorioiden tekijänoikeuksien alaiset tiedot osoittavat, että menetelmää voidaan soveltaa onnistuneesti moniin eri kudoksiin, ja monet julkaisut osoittavat, että menetelmää voidaan soveltaa muihin elimiin tai kudoksiin kuin maksaan ja mahalaukkuun, kuten tyhjäsuoleen (22), munuaiseen (23) (24), ihoon (25) (26) tai virtsarakkoon (27) (28), keuhkoihin ja bronkoalveolaarisiin lavaatiosoluihin (olennaista tutkimuksissa, joissa tutkitaan sisäänhengitettyjä kemikaaleja) (29) (30), ja lisäksi on tehty testejä, joissa on käytetty monia elimiä (31) (32).

Vaikka sukusoluihin kohdistuvat genotoksiset vaikutukset saattavatkin olla kiinnostavia, on huomattava, ettei tässä testimenetelmässä kuvattua vakiomuotoista emäksistä komeettakoetta pidetä sopivana keinona mitata DNA-säikeiden katkeamista kypsissä sukusoluissa. Koska kirjallisuuskatsauksessa komeettakokeen käytöstä sukusoluihin kohdistuvan genotoksisuuden tutkimiseen todettiin DNA-vaurioiden olevan lähtötilanteessa korkeita ja vaihtelevia (33), on välttämätöntä tehdä muutoksia protokollaan ja parantaa standardointia ja validointitutkimuksia, ennen kuin testimenetelmään voidaan sisällyttää kypsille sukusoluille (kuten siittiöille) tehtävä komeettakoe. Myöskään tämän testimenetelmän mukainen suositeltu altistusohjelma ei ole optimaalinen, ja mielekkään analyysin tekeminen DNA-säikeiden katkeamista kypsissä siittiöissä edellyttäisi pidempiä altistuksia ja näytteenottoaikoja. Komeettakokeella mitattuja genotoksisia vaikutuksia kiveksen soluissa erilaistumisen eri vaiheissa on kuvattu kirjallisuudessa (34) (35). On kuitenkin huomattava, että gonadeissa on seos somaattisia soluja ja sukusoluja. Tästä syystä positiiviset tulokset koko gonadissa (kiveksessä) eivät välttämättä kerro sukusoluille aiheutuneista vaurioista, mutta ne kertovat kuitenkin sen, että testikemikaali(t) ja/tai sen/niiden metaboliitit ovat päätyneet gonadiin asti.

Komeettakokeen vakiokoeolosuhteissa ei voida havaita luotettavasti ristisidoksia. Tietyissä muutetuissa koeolosuhteissa voidaan mahdollisesti havaita DNA–DNA- ja DNA–proteiini-ristisidoksia sekä muita emäsmuutoksia, kuten emäksen hapettumista (23) (36) (37) (38) (39). Tarvittavien protokollamuutosten asianmukainen luonnehtiminen edellyttäisi kuitenkin lisätyötä. Siksi ristisidoksia muodostavien aineiden havaitseminen ei ole tässä kuvatun kokeen päätarkoitus. Koe ei sovellu edes muutettuna aneugeenien havaitsemiseen.

Tämänhetkisen tietotason vuoksi *in vivo* -komeettakokeeseen liittyy useita lisärajoituksia (ks. lisäys 3). Odotuksena on, että testimenetelmää arvioidaan tulevaisuudessa ja tarkistetaan tarvittaessa saatujen kokemusten valossa.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

MENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille sopivaa antotapaa käyttäen. Annostelu ja näytteenotto kuvataan yksityiskohtaisesti kohdissa 36–40. Valitulla näytteenottohetkellä / valituilla näytteenottohetkillä tutkimuksen kohteena olevat kudokset leikataan, yhden solun/tuman suspensiot valmistetaan ja ne upotetaan näytelasille pehmeään agariin. Solun ja/tai tuman kalvo poistetaan käsittelemällä soluja/tumia lyysispuskurilla ja ne altistetaan vahvalle emäkselle (esimerkiksi pH ≥ 13), jotta DNA purkautuu ja irronneet DNA-ketjut ja -fragmentit vapautuvat. Tämän jälkeen agarissa olevalle tuman DNA:lle tehdään elektroforeesi. Normaalit fragmentoitumattomat DNA-molekyylit jäävät paikoilleen sinne, missä tuman DNA on agarissa, kun taas fragmentoitunut DNA ja irtonaiset DNA-ketjut liikkuvat kohti anodia. Elektroforeesin jälkeen DNA:ta tarkastellaan käyttämällä sopivaa fluoresoivaa väriainetta. Valmisteet analysoidaan käyttämällä mikroskooppia sekä täysin automatisoitua tai puoliautomaattista kuvananalysointijärjestelmää. Se, kuinka paljon ja kuinka kauas DNA:ta on liikkunut elektroforeesin aikana, kertoo DNA-fragmenttien määrästä ja koosta. Komeettakokeessa on useita päätetapahtumia. Suosituksena on, että DNA-vaurioita arvioidaan pyrstön DNA-pitoisuuden perusteella (pyrstön DNA- % eli %:a pyrstön koosta) (12) (40) (41) (42). Kun tumia on analysoitu riittävä määrä, tiedot analysoidaan sopivilla menetelmillä koetulosten arviointia varten.

On huomattava, että menetelmän eri näkökohtien muuttamista – kuten näytteen valmistelun, elektroforeesin olosuhteiden ja silmämääräisen analyysin muuttujien /(esimerkiksi väriaineen voimakkuuden, mikroskoopin valon voimakkuuden, mikroskoopin suotimien käytön ja kameran dynamiikan) muuttamista – on tutkittu ja niiden on todettu voivan vaikuttaa DNA:n kulkeutumiseen (43) (44) (45) (46).

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Kunkin laboratorion pitäisi osoittaa koemenetelmän käyttöä koskeva pätevyytensä osoittamalla kykynsä tuottaa riittävän laadukkaita yhden solun tai tuman suspensioita kunkin tutkitun lajin tutkimuksen kohteena olevasta kudoksesta / olevista kudoksista. Valmisteiden laatua arvioidaan ennen kaikkea sen perusteella, onko kantaja-aineella käsitellyistä eläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuus (%) toistettavissa olevalla alhaisella vaihteluvälillä. Nykyisten tietojen perusteella rotan maksasta saatu keskimääräinen ryhmän pyrstön DNA-pitoisuus (%) (joka perustuu mediaanien keskiarvoon – ks. asiaa koskevat tarkemmat tiedot kohdasta 57) ei saa mielellään olla yli 6 prosenttia, mikä olisi linjassa JaCVAMin validointitutkimuksen (12) arvojen sekä muiden julkaistujen tietojen ja tekijänoikeuksien alaisten tietojen kanssa. Tällä hetkellä tietoja ei ole tarpeeksi, jotta muiden kudosten osalta voitaisiin antaa suosituksia optimaalisista tai hyväksyttävistä vaihteluväleistä. Tämä ei silti estä käyttämästä muita kudoksia, jos se on perusteltua. Testiraportissa pitäisi esittää asianmukainen arvio komeettakokeen suorituskyvystä näiden kudosten osalta suhteessa julkaistuun kirjallisuuteen tai tekijänoikeuksien alaisiin tietoihin. Ensinnäkin on suotavaa, että kontrolleissa pyrstön DNA-pitoisuuden (%) vaihteluväli on alhainen, jotta vaihteluväli on riittävän dynaaminen positiivisen vaikutuksen havaitsemiseksi. Toiseksi kunkin laboratorion pitäisi kyetä toistamaan odotetut vasteet suorien mutageenien ja pro-mutageenien osalta eri toimintatavoilla taulukon 1 mukaisesti (kohta 29).

Positiivisia aineita voidaan valita tarvittaessa esimerkiksi JaCVAMin validointikokeesta (12) tai muista julkaistuista tiedoista (ks. 9 kohta) esittäen perustelut ja osoittamalla selvät positiiviset vasteet kiinnostuksen kohteena olevissa kudoksissa. Lisäksi pitäisi osoittaa kyky havaita tunnettujen mutageenien, kuten EMS:n, heikkoja vaikutuksia pienillä annoksilla, esimerkiksi vahvistamalla annos-vastesuhde sopivalla määrällä annoksia ja sopivilla annosväleillä. Ensitoimissa pitäisi keskittyä pätevyyden osoittamiseen yleisimmin käytettyjen kudosten, kuten jyrsijän maksan osalta, sillä vertaaminen olemassa oleviin tietoihin ja odotettavissa oleviin tuloksiin on mahdollista (12). Muista kudoksista, kuten vatsalaukusta, pohjukaissuolesta, tyhjäsuolesta, verestä jne., voidaan kerätä tiedot samaan aikaan. Laboratorion on osoitettava pätevyytensä kunkin tutkittavan lajin kunkin yksittäisen tutkittavan kudoksen osalta sekä se, että kyseisissä kudoksissa voidaan saada aikaan tunnetulla mutageenilla (kuten EMS:llä) hyväksyttävä positiivinen vaste.

Kantaja-aineen / negatiivisen kontrollin tiedot pitäisi kerätä, jotta voidaan osoittaa negatiivisten datavasteiden toistettavuus, varmistaa kokeen teknisten näkökohtien asianmukainen valvonta ja tuoda esiin tarve määrittää aikaisemmat kontrollien vaihteluvälit uudelleen (ks. 22 kohta).

On huomattava, että vaikka ruumiinavauksessa voidaan kerätä useita kudoksia ja prosessoida niitä komeettakoetta varten, laboratorion on oltava pätevä keräämään useita kudoksia samalta eläimeltä, jotta voidaan varmistaa, ettei mahdollista DNA-vaurioita menetetä eikä komeettakoe vaarannu. Ajalla, joka kuluu lopettamisesta prosessoitavien kudosten poistamiseen, saattaa olla ratkaiseva merkitys (ks. 44 kohta).

Hankittaessa pätevyyttä tämän testin käyttöön on otettava huomioon eläinten hyvinvointi, ja siksi muissa testeissä käytettyjä eläinperäisiä kudoksia voidaan käyttää tämän testin eri näkökohtiin liittyvän osaamisen kartuttamiseen. Lisäksi laboratorion ottaessa käyttöön uutta testimenetelmää prosessin eri vaiheissa ei välttämättä ole tarpeen tehdä kattavaa tutkimusta, ja tarvittavia taitoja hankittaessa voidaan käyttää pienempää määrää eläimiä tai testipitoisuuksia.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyystutkimusten aikana laboratorion pitäisi luoda aiempia tietoja sisältävä tietokanta määrittääkseen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit ja jakaumat tiettyjen kudosten ja lajien osalta. Suosituksia tällaisen tietokannan luomisesta ja käytöstä (eli perusteet, joiden perusteella tietoja valitaan mukaan aiempiin tietoihin tai ei valita, sekä hyväksyttävyysperusteet tietyn kokeen osalta) annetaan kirjallisuudessa (47). Erilaiset kudokset ja eri lajit sekä eri kantajat ja annostelureitit voivat johtaa erilaisiin negatiivisiin vertailuarvoihin pyrstön DNA-pitoisuuden (%) osalta. Siksi negatiivisen kontrollin vaihteluvälit on tärkeää määrittää kunkin kudoksen ja lajin osalta. Laboratorioiden pitäisi määrittää käyttämällä laadunvalvontamenetelmiä, kuten kontrollikaavioita (esimerkiksi C-kaavioita tai X-pylväskaavioita (48)), minkä verran niiden tiedoissa on vaihtelua, sekä osoittaa valvovansa menetelmää. Lisäksi heikkojen vaikutusten havaitsemiseksi (ks. 17 kohta) saattaa olla tarpeen optimoida sopivien positiivisten kontrolliaineiden, annosten vaihteluvälien ja koeolosuhteiden (esimerkiksi elektroforeesiolosuhteet) valintaa.

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa.. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmistelut

Eläinlajin valinta

Kokeessa käytetään normaalisti yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä (jotka ovat käsittelyn alussa 6–10 viikon ikäisiä, joskin hieman vanhemmatkin eläimet voidaan hyväksyä). Jyrsijälajia valittaessa päätöksen pitäisi perustua (i) lajeihin, joita on käytetty muissa toksisuustutkimuksissa (tietojen korreloinnin ja integroitujen tutkimusten mahdollistamiseksi), (ii) lajeihin, joille on kehittynyt kasvaimia jossakin karsinogeenisyystutkimuksessa (tutkittaessa karsinogeneesin mekanismia), tai (iii) lajeihin, joiden metabolismi on ihmisten kannalta merkityksellisin, jos se tunnetaan. Testissä käytetään yleensä rottia. Muiden lajien käyttö on kuitenkin myös mahdollista, jos se on eettisesti ja tieteellisesti perusteltua.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Koe-eläintilan ihanteellinen lämpötila on jyrsijöille 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden pitäisi olla ihanteellisesti 50–60 prosenttia, vähintään kuitenkin 30 prosenttia ja mieluiten enintään 70 prosenttia muulloin kuin tilan siivouksen yhteydessä. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Samaa sukupuolta olevat jyrsijät olisi pidettävä häkeissä pienissä ryhmissä (yleensä enintään viisi), jos minkäänlaista aggressiivista käytöstä ei ole odotettavissa. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin vain, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Lattian pitäisi olla tasainen, jos se vain on mahdollista, sillä verkkolattia voi aiheuttaa vakavia vammoja (49). Eläimille on järjestettävä sopivia virikkeitä.

Eläinten valmistelu

Eläimet jaetaan verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen käsittelyn aloittamista. Eläinten yksilöllisessä merkinnässä on käytettävä vähiten kajoavaa menetelmää. Sopivia menetelmiä ovat muun muassa rengastaminen, merkin kiinnittäminen, mikrosirun asettaminen ja biometrinen tunnistaminen. Varpaiden tai korvien leikkaaminen ei ole tieteellisesti perusteltua näissä testeissä. Häkit tulee järjestää siten, että niiden sijoittamisesta mahdollisesti aiheutuvat vaikutukset minimoituvat. Tutkimuksen alussa eläinten painon vaihtelun pitäisi olla mahdollisimman vähäistä, alle ± 20 prosenttia.

Annosten valmistelu

Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin kantajiin tai lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista riippuen (50) (51).

Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet

Kantaja

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla toksisia vaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista testikemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava tutkimustuloksilla, jotka osoittavat niiden yhteensopivuuden testieläinten, annostelutavan ja päätetapahtuman kanssa. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. On huomattava, että jotkin kantajat (erityisesti viskoosiset kantaja-aineet) voivat aiheuttaa tulehdusta ja lisätä DNA-säikeiden katkoksien taustatasoa kosketuskohdassa, erityisesti jos annostelukertoja on useita.

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Tässä yhteydessä kussakin testissä pitäisi normaalisti olla mukana positiivisella kontrolliaineella käsitelty ryhmä, joka muodostuu vähintään kolmesta analysoitavasta eläimestä, jotka edustavat samaa sukupuolta tai kumpaakin sukupuolta, jos kumpaakin sukupuolta käytetään (ks. 32 kohta). Tulevaisuudessa positiivisten kontrollien tarvetta voidaan mahdollisesti vähentää osoittamalla riittävä pätevyys. Jos näytteenottoajankohtia on useita (esimerkiksi testiprotokollassa, jossa annostelukertoja on yksi), positiiviset kontrollit otetaan mukaan vain yhteen näytteenottoajankohtaan, mutta tasapaino kokeen suunnittelussa on turvattava (ks. 48 kohta). Samanaikaisia positiivisia kontrolliaineita ei tarvitse antaa samaa reittiä kuin testikemikaalia, vaikka onkin tärkeää, että samaa reittiä käytetään mitattaessa vaikutuksia kosketuskohdassa. Positiivisten kontrolliaineiden pitäisi osoittaa katkovan DNA-säikeitä kaikissa testikemikaalin kannalta kiinnostavissa kudoksissa, ja EMS sopii todennäköisesti positiiviseksi kontrolliksi, sillä se on katkonut DNA-säikeitä kaikissa tutkituissa kudoksissa. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava niin, että niillä saadaan aikaan kohtalaiset vaikutukset, joiden perusteella voidaan arvioida kriittisesti kokeen suorituskykyä ja herkkyyttä, ja ne voivat perustua annos-vastekäyriin, jotka laboratorio on määrittänyt pätevyyden osoittamisen aikana. Samanaikaisesti positiivisella kontrollilla käsitellyistä eläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuuden (%) pitäisi vastata vaihteluväliä, jonka laboratorio on vahvistanut ennalta kyseisen lajin kunkin yksittäisen kudoksen ja näytteenottoajankohdan osalta (ks. 16 kohta). Taulukko 1 sisältää esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista ja muutamista niiden kohdekudoksista (jyrsijöillä). Muita kuin taulukossa 1 mainittuja aineita voidaan valita, jos se on tieteellisesti perusteltua.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista ja muutamista niiden kohdekudoksista

Aineet ja CAS RN -nro
Etyylimetaanisulfonaatti (CAS RN 62-50-0), mikä tahansa kudos
Ethyylinitrosourea (CAS RN 759-73-9), maksa ja mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli
Metyylimetaanisulfonaatti (CAS RN 66-27-3), maksa, mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli, keuhko ja bronkoalveolaariset lavaatiosolut (BAL), munuainen, virtsarakko, keuhko, kives ja luuydin/veri
N-metyyli-N′-nitro-N-nitrosoguanidiini (CAS RN 70-25-7), mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli
1,2-dimetyylihydratsiini 2HCl (CAS RN 306-37-6), maksa ja suolisto
N-metyyli-*N*-nitrosourea (CAS RN 684-93-5), maksa, luuydin, veri, munuainen, mahalaukku, tyhjäsuoli ja aivot

Negatiiviset kontrollit

Kussakin testissä pitäisi olla kunakin näytteenottoajankohtana ja kunkin kudoksen osalta mukana negatiivisten kontrollieläinten ryhmä, joka käsitellään pelkällä kantaja-aineella mutta jota muutoin käsitellään samalla tavalla kuin muita tutkittavia ryhmiä. Negatiivisista kontrollieläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuuden (%) pitäisi vastata taustapitoisuuden vaihteluväliä, jonka laboratorio on vahvistanut ennalta kyseisen lajin kunkin yksittäisen kudoksen ja näytteenottoajankohdan osalta (ks. 16 kohta). Ellei olemassa ole aiempia tai julkaistuja kontrollitietoja, jotka osoittaisivat, että valittu kantaja-aine, annosten määrä tai annostelureitti ei aiheuta deleetetioita tai genotoksisia vaikutuksia, ennen koko tutkimuksen tekemistä pitäisi tehdä alustavia tutkimuksia, joilla määritetään kantajakontrollin hyväksyttävyys.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Vaikka saatavana onkin varsin vähän naaraisiin liittyviä tietoja, joiden perusteella voitaisiin tehdä komeettakokeeseen liittyviä sukupuolten välisiä vertailuja, muut *in vivo* -genotoksisuusvasteet ovat yleensä naarailla ja uroksilla samankaltaisia, minkä vuoksi useimmat tutkimukset voitaisiin tehdä kummalle sukupuolelle tahansa. Tiedot, jotka osoittavat naaraiden ja urosten välillä olevan olennaisia eroja (esimerkiksi eroja, jotka liittyvät systeemiseen toksisuuteen, metabolismiin, biologiseen hyötyosuuteen jne., mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) kannustavat molempien sukupuolten käyttöön. Tässä tapauksessa saattaa olla sopivaa tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esimerkiksi osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla sopivaa tehdä yhdistelykoe. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Tutkimuksen alussa (ja pätevyyden osoittamisen aikana) ryhmien koot pitäisi valita niin, että yhdessä ryhmässä on vähintään viisi yhtä sukupuolta edustavaa eläintä – tai molempia sukupuolia käytettäessä vähintään viisi kumpaakin sukupuolta edustavaa eläintä (ja samanaikaisessa positiivisessa kontrolliryhmässä vähemmän; ks. 29 kohta). Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta käyttäen. Eläinten tyypillistä enimmäismäärää koskeviin vaatimuksiin liittyvänä ohjeena todettakoon, että kohdan 33 mukaisesti tehtävä tutkimus, jossa käytetään kolmea annosryhmää ja samanaikaisesti negatiivista ja positiivista kontrollia (kussakin ryhmässä viisi samaa sukupuolta edustavaa eläintä), vaatisi 25–35 eläintä.

ALTISTUSOHJELMA

Eläimiä pitäisi käsitellä päivittäin vähintään kahden päivän ajan (eli vähintään kahdesti noin 24 tunnin välein), ja näytteet pitäisi kerätä kerran 2–6 tunnin kuluttua (eli hetkellä T_{max}) viimeisestä käsittelystä (12). Pitempien altistusohjelmien aikana (esimerkiksi 28 päivän altistus) kerätyt näytteet ovat hyväksyttäviä. Komeettakokeen ja erytrosyyttimikrotumatestin yhdistämisen on osoitettu onnistuneen (10) (19). Komeettakokeen kudosnäytteiden ottamiseen liittyvää logistiikkaa sekä muunlaisten toksikologisten arvioiden näytteenottovaatimuksia on kuitenkin punnittava huolellisesti. Yleiselle toksisuustutkimukselle tyypillinen keruu 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta ei sovellu useimpiin tapauksiin (ks. 40 kohta näytteenottoajasta). Muiden käsittely- ja näytteenottoaikataulujen käyttö on perusteltava (ks. lisäys 3). Esimerkiksi kerta-annostelun ja usean näytteenoton käyttö on mahdollista, mutta kerta-annostutkimukseen tarvitaan enemmän eläimiä, koska näytteenottoajankohtia on oltava useita; toisinaan tämä voi kuitenkin olla suotava vaihtoehto, esimerkiksi silloin, kun testikemikaalin toistuva annostelu aiheuttaa liiallista toksisuutta.

Testi on hyväksyttävä testitavasta riippumatta, kunhan testikemikaali antaa positiivisen vasteen tai – jos kyse on negatiivisesta tutkimuksesta – kunhan saadaan suoraa tai välillistä näyttöä, joka tukee kiinnostuksen kohteena olevan kudoksen (olevien kudosten) altistumista taikka toksisuutta kudokselle (kudoksille) tai jos raja-annos saavutetaan (ks. 36 kohta).

Testikemikaalit voidaan antaa myös jaettuina annoksina, jolloin käsittelyjä on kaksi samana päivänä enintään 2–3 tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Tällöin näytteenotto pitäisi ajoittaa viimeisen annoksen antamisajankohdan perusteella (ks. 40 kohta).

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska muista olennaisista tutkimuksista ei ole saatavilla soveltuvia tietoja, jotka auttaisivat annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa sukupuolta olevia eläimiä sekä samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää, annoksenmääritystutkimusta koskevien nykyisten lähestymistapojen mukaisesti. Tutkimuksessa pitäisi pyrkiä määrittämään suurin siedetty annos (MTD-arvo) eli annos, joka aiheuttaa lievästi toksisen vaikutuksen suhteessa tutkimusjakson kestoon (esimerkiksi selviä kliinisiä merkkejä, kuten epänormaalia käytöstä tai reagointia, vähäistä painonlaskua tai kohdekudoksen sytotoksisuutta), mutta ei kuolemaa tai merkkejä kivusta, kärsimyksestä tai stressistä, joka edellyttäisi eläimen lopettamista. Kun kyseessä on myrkytön testikemikaali, jonka annosteluaika on vähintään 14 päivää, enimmäisannos (raja-annos) on 1 000 mg/painokilo/päivä. Kun annosteluaika on alle 14 päivää, enimmäisannos (raja-annos) on 2 000 mg/painokilo/päivä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyn tyyppisten testikemikaalien kohdalla (esimerkiksi ihmisten lääkkeet), joihin sovelletaan erityisiä sääntöjä.

Annoksenmääritysperusteista voidaan poiketa sellaisten kemikaalien kohdalla, jotka ilmentävät toksikokineettisten ominaisuuksien tyydyttymistä tai aiheuttavat detoksifikaatioprosesseja, jotka voivat puolestaan johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen annostelun jälkeen. Näitä perusteita pitäisikin arvioida tapauskohtaisesti.

Komeettakokeen akuuteissa ja subakuuteissa versioissa enimmäisannoksen (suurin siedetty annos, suurin käyttökelpoinen annos, enimmäisaltistus tai raja-annos) lisäksi kullekin näytteenottoajalle on valittava ainakin kahdesta ylimääräisestä, sopivin välein annettavasta annoksesta muodostuva alenevan annostason sarja (annosten väli on mieluiten alle 10) annoksesta riippuvan vasteen osoittamiseksi. On suotavaa, että nämä annostasot kattavat vaihteluvälin enimmäisannoksesta annokseen, jolla on vähäinen myrkkyvaikutus tai ei myrkkyvaikutusta lainkaan. Kun kohdekudoksen toksisuus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä lisätutkimuksia ei-toksisilla annoksilla (ks. 54–55 kohta). Tutkimukset, joiden tarkoituksena on tutkia kattavammin annos-vastekäyrän muotoa, saattavat edellyttää ylimääräisiä annosryhmiä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistumisreitti – kuten ruoan, juomaveden tai ihoaltistuksen kautta, ihonalaisesti, suonensisäisesti, suun kautta (letkulla), hengittämällä, intratrakeaalisesti tai implantaation kautta tapahtuva altistuminen – voidaan valita sen mukaan, mikä on perusteltua. Joka tapauksessa reitti pitää valita tavalla, jolla varmistetaan tutkimuksen kohteena olevan kudoksen (olevien kudosten) asianmukainen altistuminen. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, sillä se ei ole ihmiselle tyypillinen ja merkittävä altistumisreitti, ja sitä pitäisikin käyttää vain, jos sille on erityisiä perusteita (esimerkiksi jotkin positiiviset kontrolliaineet tutkimustarkoituksiin tai jotkin lääkkeet, joita annetaan intraperitoneaalisesti). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Aina kun mahdollista, eri annostasot pitäisi saavuttaa säätämällä valmisteannoksen pitoisuutta niin, että määrä pysyy tasaisena suhteessa kehonpainoon kaikilla annostasoilla.

Näytteenottoaika

Näytteenottoaika on kriittinen muuttuja, sillä se riippuu siitä, missä ajassa kohdekudoksessa saavutetaan testikemikaalin enimmäispitoisuus ja DNA-säikeet katkeavat, mutta nämä katkeamat eivät poistu, korjaannu tai johda solun kuolemaan. Tietyt vauriot, jotka aiheuttavat komeettakokeella havaittavia DNA-säikeiden katkeamia, saattavat olla hyvin lyhytkestoisia ainakin joidenkin *in vitro* -testattujen kemikaalien osalta (52) (53). Siksi tällaisia väliaikaisia DNA-vaurioita epäiltäessä on ryhdyttävä toimenpiteisiin, joilla estetään niiden menettäminen, varmistamalla, että kudosnäytteet kerätään riittävän aikaisin, mahdollisesti jo ennen jäljempänä esitettyjä oletusajankohtia. Optimaalinen näytteenottoaika saattaa (optimaaliset näytteenottoajat saattavat) riippua kemikaalista ja antoreitistä ja johtaa esimerkiksi kudoksen nopeaan altistumiseen, jos annostelu tapahtuu suonensisäisesti tai altistus tapahtuu hengittämällä. Siksi näytteenottoajat pitäisi määrittää kineettisten tietojen pohjalta (esimerkiksi aika (T_{max}), jossa saavutetaan plasman tai kudoksen huippupitoisuus (C_{max}) tai monen annoksen tapauksessa vakaa tila), jos sellaisia on saatavana. Ellei kineettisiä tietoja ole saatavana, sopiva kompromissiratkaisu genotoksisuuden mittaamisen kannalta on kerätä näytteet, kun viimeisestä käsittelystä on kulunut 2–6 tuntia (kahden tai useamman käsittelyn tapauksessa) tai kun kerta-annoksen antamisesta on kulunut 2–6 tuntia ja 16–26 tuntia, joskin on huolehdittava, että kaikkien eläinten ruumiinavaus tehdään samana ajankohtana viimeisen (tai ainoan) annoksen jälkeen. Sopivien näytteenottoaikojen valinnassa on käytettävä myös tietoja toksisten vaikutusten ilmenemisestä kohde-elimessä (jos niitä on saatavana).

Havainnot

Yleisiä kliinisiä havaintoja eläinten terveydentilasta tulee tehdä ja kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan (samoihin aikoihin) joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan (54). Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Kestoltaan pidemmissä tutkimuksissa kaikki eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa ja testijakson päättyessä. Ruoan kulutusta on mitattava, kun ruoka vaihdetaan, ja ainakin kerran viikossa. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan, tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä, eikä niitä yleensä käytetä komeetta-analyysiin.

Kudosnäytteiden kerääminen

Koska DNA-säikeiden katkeamia (komeettoja) voidaan mahdollista tutkia melkeinpä mistä tahansa kudoksista, kudoksen/kudosten valintaperusteet pitäisi määrittää selvästi ja niiden pitäisi perustua syyhyn, jonka vuoksi tutkimus tehdään, sekä olemassa oleviin, tutkittavia testikemikaaleja koskeviin ADME-, genotoksisuus- tai karsinogeenisyystietoihin tai muuta toksisuutta koskeviin tietoihin. Tärkeitä huomioon otettavia seikkoja ovat muun muassa annostelureitti (joka riippuu ihmisen todennäköisestä altistumisreitistä / todennäköisistä altistumisreiteistä), ennakoitu leviäminen ja absorptio kudoksessa, metabolismin rooli sekä testikemikaalien mahdollinen toimintamekanismi. Useimmin tutkittu kudos on maksa, ja siitä on myös saatavana eniten tietoa. Siksi tilanteessa, jossa

taustatietoja ei ole eikä erityistä mielenkiinnon kohteena olevaa kudosta ole määritetty, on perusteltua ottaa näyte maksasta, sillä se on ksenobioottisen metabolismin ensisijainen paikka ja se altistuu usein voimakkaasti sekä emoaineelle/-aineille että metaboliitille/metaboliiteille. Joissakin tapauksissa saattaa olla mielekkäintä tutkia suoralle kontaktille altistuvaa kohtaa (esimerkiksi suun kautta annosteltujen kemikaalien tapauksessa rauhasmahaa tai pohjukaissuolta/tyhjäsuolta tai hengitettyjen kemikaalien tapauksessa keuhkoja). Jos ylimääräisiä tai vaihtoehtoisia kudoksia valitaan, valinnan pitäisi perustua syihin, joiden vuoksi testi tehdään, mutta samojen eläinten useiden kudosten tarkastelusta saattaa olla hyötyä, jos laboratorio on osoittanut pätevyytensä kyseisten kudosten osalta ja pystyvänsä käsittelemään useita kudoksia samaan aikaan.

Näytteiden valmistelu

Seuraavissa kohdissa (44–49) kuvatuissa prosesseissa on tärkeää, että kaikki liuokset tai vakaat suspensiot käytetään ennen niiden käyttöajan päättymistä tai tarvittaessa heti niiden valmistuksen jälkeen. Lisäksi seuraavissa kappaleissa (i) kunkin kudoksen poistamiseen ruumiinavauksen jälkeen, (ii) kunkin kudoksen prosessointiin ja solu-/tumasuspensioiden valmistamiseen sekä (iii) suspension prosessointiin ja näytelasien valmisteluun kuluvat ajat ovat kaikki kriittisiä muuttujia (ks. määritelmät lisäyksestä 1), ja kussakin vaiheessa hyväksyttävät ajat on pitänyt määrittää menetelmän käyttöönoton ja pätevyyden osoittamisen yhteydessä.

Eläimet lopetetaan voimassa olevan eläinsuojelulainsäädännön ja 3R-periaatteiden mukaisesti sopivana ajankohtana / sopivina ajankohtina viimeisen testikemikaalilla tehdyn käsittelyn jälkeen. Valittu kudos / valitut kudokset poistetaan ja leikataan ja osa otetaan talteen komeettakoetta varten, ja samalla kudoksen samasta osasta otetaan leike, joka pannaan formaldehydiliuokseen tai sopivaan fiksatiiviin mahdollista histopatologista analyysia varten (ks. 55 kohta) vakiomenetelmien mukaisesti (12). Komeettakoetta varten otettu kudos pannaan hienonnuspuskuriin, verijäämät poistetaan huuhtelemalla sitä riittävästi kylmällä hienonnuspuskurilla ja kudosta säilytetään jääkylmässä hienonnuspuskurissa, kunnes se prosessoidaan. Esimerkiksi maksalle tai munuaiselle voidaan tehdä myös perfuusio *in situ*.

Solun/tuman eristämiseen on olemassa monia julkaistuja menetelmiä. Niihin kuuluvat muun muassa kudosten, kuten maksan ja munuaisen, hienontaminen, limakalvopintojen raaputus ruoansulatuskanavan tapauksessa, homogenointi ja sulatus entsyymillä. JaCVAM-validointikokeessa tutkittiin vain eristettyjä soluja, ja siksi eristetyt solut ovat parempia siltä osin kuin kyse on menetelmän käyttöönotosta ja edellytyksistä viitata JaCVAM testitietoihin pätevyyden osoittamiseksi. On kuitenkin osoitettu, ettei tuloksissa ollut olennaista eroa sen perusteella, käytettiinkö kokeessa eristettyjä soluja vai tumia (8). Myös solujen/tumien eristämiseen käytetyt eri menetelmät (esimerkiksi homogenointi, hienontaminen, sulatus entsyymillä ja verkkosuodatus) antoivat vertailukelpoisia tuloksia (55). Siten kokeessa voidaan käyttää joko eristettyjä soluja tai eristettyjä tumia. Laboratorion pitäisi arvioida perusteellisesti ja validoida kudoskohtaiset menetelmät yksittäisen solun/tuman eristämiseen. Kuten kohdassa 40 on todettu, jotkin vauriot, jotka aiheuttavat komeettakokeella havaittavia DNA-säikeiden katkeamia, saattavat olla hyvin lyhytkestoisia (52) (53). Siksi riippumatta siitä, mitä menetelmää yhden solun/tuman suspensioiden valmistamiseen käytetään, on tärkeää, että kudokset prosessoidaan mahdollisimman pian eläinten lopettamisen jälkeen ja saatetaan olosuhteisiin, jotka ehkäisevät vaurioiden häviämistä (esimerkiksi kudoksen säilyttäminen alhaisessa lämpötilassa). Solususpensiot on pidettävä jääkylminä, kunnes ne ollaan valmiita käyttämään, jotta näytteiden välinen variaatio on mahdollisimman vähäistä ja jotta voidaan osoittaa sopivat positiiviset ja negatiiviset kontrollivasteet.

NÄYTELASIEN VALMISTELU

Näytelasit pitäisi valmistella mahdollisimman pian (ihanteellisesti tunnin sisällä) yhden solun/tuman valmistelusta, mutta lämpötilaa sekä eläimen kuoleman ja näytelasin valmistelun välistä aikaa on valvottava tarkkaan ja ne on validoitava laboratorion olosuhteissa. Näytelasien valmisteluun käytettävään alhaisen sulamispisteen agaroosiin lisättävän solususpension määrä (yleensä 0,5–1,0 prosenttia) ei saa laskea alhaisen sulamispisteen agaroosin osuutta alle 0,45 prosenttiin. Optimaalinen solutiheys määritetään komeettojen arviointiin käytettävällä kuva-analyysijärjestelmällä.

Lyysis

Myös lyysisolosuhteet ovat kriittinen muuttuja ja saattavat vaikuttaa säikeiden katkeamiseen, joka johtuu eri tyyppisistä DNA-muutoksista (tietyistä DNA-alkylaatioista ja emäsaddukteista). Siksi suositellaan, että lyysisolosuhteet pidetään mahdollisimman tasaisina kaikkien kokeessa käytettävien näytelasien osalta. Kun näytelasit on valmisteltu, ne upotetaan jäähdytettyyn (noin 2–8 °C) lyysisliuokseen ainakin yhdeksi tunniksi (tai yön yli) ja niitä pidetään heikoissa valaistusolosuhteissa (esimerkiksi keltaisessa valossa tai valoa läpäisemättömässä paikassa), jotta vältetään niiden altistuminen valkoiselle valolle, joka saattaa sisältää UV-komponentteja. Tämän inkubaatiovaiheen jälkeen näytelaseista huuhdellaan pois puhdistusainejäämät ja suolot ennen emäksen purkamisvaihetta. Tähän voidaan käyttää puhdistettua vettä, neutralointipuskuria tai fosfaattipuskuria. Myös elektroforeesipuskurin käyttäminen on mahdollista. Tämä pitää olosuhteet emäksisinä elektroforeesikammiossa.

Purkaminen ja elektroforeesi

Näytelasit asetetaan upotettavaa tyyppiä olevan elektroforeesiyksikön tasolle satunnaisesti; elektroforeesiliuosta on oltava riittävästi, jotta näytelasien pinnat peittyvät täysin (peittymissyvyys pitäisi pitää samana joka ajossa). Komeettakokeessa käytetyissä toisenlaisissa elektroforeesiyksiköissä, joissa on aktiivinen jäähdytys, kierto ja tehokas virtalähde – näytelasien upottaminen syvemmälle liuokseen johtaa suurempaan sähkövirtaan jännitteen pysyessä ennallaan. Näytelasit pitäisi asettaa elektroforeesisäiliöön tasapainoisella tavalla, jotta säiliössä ei ilmene erityisiä suuntauksia tai reunavaikutuksia ja jotta erien välinen vaihtelu saadaan pidettyä mahdollisimman vähäisenä; toisin sanoen kussakin elektroforeesiajossa pitäisi olla sama määrä näytelaseja kustakin tutkimuksessa käytetystä eläimestä sekä näytteitä eri annosryhmistä, negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Näytelasit pitäisi jättää liuokseen ainakin 20 minuutiksi DNA:han purkautumista varten, minkä jälkeen elektroforeesi pitäisi tehdä hallituissa oloissa, joilla maksimoidaan kokeen herkkyys ja dynamiikka-alue (eli jotka johtavat pyrstön DNA-pitoisuutta koskeviin hyväksyttäviin tasoihin herkkyyden maksimoivien negatiivisten ja positiivisten kontrollien osalta). DNA:n kulkeutumisen aste riippuu lineaarisesti elektroforeesin kestosta sekä jännitteestä (V/cm). JaCVAMin kokeen perusteella se voisi olla 0,7 V/cm vähintään 20 minuutin ajan. Elektroforeesin kestoa pidetään kriittisenä muuttujana, ja elektroforeesiaika pitäisi valita siten, että dynamiikka-alue optimoidaan. Pidemmät elektroforeesiajat (esimerkiksi 30 tai 40 minuuttia herkkyyden maksimoimiseksi) johtavat yleensä vahvempiin positiivisiin vasteisiin tunnettujen mutageenien kanssa. Pidemmät elektroforeesiajat voivat kuitenkin myös aiheuttaa liiallista kulkeutumista kontrollinäytteissä. Kussakin kokeessa jännite pitäisi pitää vakiona, ja muiden muuttujien vaihtelun pitäisi pysyä tietyllä kapealla vaihteluvälillä; esimerkkinä mainittakoon JaCVAM-kokeessa 300 mA:n käynnistymisvirralla saatu 0,7 V/cm. Puskurin syvyyttä pitäisi säätää niin, että vaaditut olosuhteet saavutetaan ja ne säilyvät koko kokeen ajan. Virta elektroforeesijakson alussa ja lopussa on kirjattava. Siksi optimaaliset olosuhteet pitäisi määrittää pätevyyden osoittamisen alkuvaiheessa kyseisessä laboratoriossa kullakin tutkitulla kudoksella. Purkamisen ja elektroforeesin aikana elektroforeesiliuoksen lämpötila pitäisi pitää alhaisena, yleensä 2–10 °C:ssä (10). Elektroforeesiliuoksen lämpötila purkamisen alussa, elektroforeesin alussa ja elektroforeesin lopussa on kirjattava.

Elektroforeesin päättyessä näytelasit on upotettava neutralointipuskuriin tai niitä on huuhdeltava neutralointipuskurilla vähintään viiden minuutin ajan. Geelit voidaan värjätä ja arvioida ”tuoreina” (esimerkiksi 1–2 päivän sisällä) tai ne voidaan kuivattaa myöhempää arviointia varten (esimerkiksi 1–2 viikon kuluttua värjäämisestä) (56). Olosuhteet pitäisi kuitenkin validoida pätevyyden osoittamisen aikana, ja kustakin tällaisesta olosuhteesta pitäisi hankkia ja säilyttää aiempia tietoja. Jälkimmäisessä vaihtoehdossa näytelasit pitäisi kuivattaa upottamalla ne puhtaaseen etanoliin vähintään viideksi minuutiksi ja antamalla niiden kuivua ilmassa, minkä jälkeen niitä säilytetään joko huoneenlämmössä tai säiliössä jääkaapissa, kunnes ne arvioidaan.

Mittausmenetelmät

Komeettoja pitäisi arvioida kvantitatiivisesti käyttämällä automaattista tai puoliautomaattista kuva-analyysijärjestelmää. Näytelasit värjätään käyttämällä sopivaa fluoresoivaa väriainetta, esimerkiksi SYBR Gold -väriainetta, Green I -väriainetta, propidiumjodidia tai etidiumbromidia, ja mitataan sopivaa suurennusta (esimerkiksi 200 ×) käyttäen mikroskoopilla, jossa on epifluoresenssivarustus ja sopivat detektorit tai digitaalinen kamera (esimerkiksi CCD-kamera).

Solut voidaan jakaa kolmeen komeettoja esittelevässä kuvastossa (57) esitettyyn luokkaan: nimittäin arviointikelpoisiin, arviointikelvottomiin ja niin sanottuihin ”siileihin” (ks. lisätietoja 56 kohdasta). Artefaktien välttämiseksi pyrstön DNA-pitoisuutta pitäisi arvioida vain arviointikelpoisista soluista (joiden ydin ja pyrstö erottuvat selvästi, ilman että viereiset solut aiheuttavat sekaannusta). Arviointikelvottomien solujen tiheyttä ei ole tarpeen raportoida. Ns. siilien tiheys pitäisi määrittää silmämääräisen laskennan perusteella (sillä kuva-analyysi ei havaitse selvästi soluja, joista puuttuu selväpiirteinen ydin), jos näytteessä on niitä ainakin 150 (ks. lisätietoja 56 kohdasta), ja ne pitäisi dokumentoida erikseen.

Kaikki analysoitavat näytelasit, mukaan lukien positiiviset ja negatiiviset kontrollit, pitäisi merkitä erikseen tunnisteella ja niitä pitäisi arvioida ”sokkona”, jotta arvioitsija ei tiedä, mistä käsittelystä on kyse. Kustakin näytteestä (yksi näyte kudosta kohti, yksi kudos eläintä kohti) pitäisi analysoida vähintään 150 solua (lukuun ottamatta ns. siilejä, ks. 56 kohta). 150 solun arviointi eläintä kohti, niin että eläimiä on ainakin viisi yhtä annosta kohti (vähemmän samanaikaisessa positiivisessa kontrollissa, ks. 29 kohta) antaa Smithin *et al.*, 2008 analyysin mukaan (5) riittävän tilastollisen voiman. Kun eläimiä on yhdessä ryhmässä viisi, tämä voisi näytelaseja käytettäessä tarkoittaa 2:ta–3:a näytelasia yhtä näytettä kohti. Näytelasista pitäisi arvioida useita alueita, joiden sijainti valitaan siten, että pyrstöjen päällekkäisyyden mahdollisuus suljetaan pois. Näytelasien reunojen arviointia pitäisi välttää.

Komeettakokeessa DNA-säikeiden katkeamia voidaan arvoida käyttämällä riippumattomia päätetapahtumia, kuten pyrstön DNA-pitoisuutta (%), pyrstön pituutta ja pyrstön momenttia. Kaikki kolme mittausta voidaan tehdä käyttämällä sopivaa kuvien analysointiohjelmaa. Tulosten arviointiin ja tulkintaan suositellaan käytettävän pyrstön DNA-pitoisuutta (%) (johon viitataan myös ilmaisulla ”%:a pyrstön koosta”) (12) (40) (41) (42), ja sen ratkaisee DNA-fragmenttien määrä pyrstössä ilmaistuna prosentteina solun kokonaiskoosta (13).

Kudosvaurio ja sytotoksisuus

Positiiviset havainnot komeettakokeessa eivät välttämättä johdu yksin genotoksisuudesta, vaan myös kohdekudoksen toksisuus voi lisätä DNA:n siirtymistä (12) (41). Sitä vastoin tunnettujen genotoksiinien yhteydessä nähdään usein alhaista tai kohtalaista sytotoksisuutta (12), mikä osoittaa, että genotoksisuuden aiheuttamaa DNA:n siirtymistä ei ole mahdollista erottaa sytotoksisuuden aiheuttamasta siirtymisestä yksin komeettakokeessa. Kun DNA:n kulkeutumisen havaitaan lisääntyneen, on kuitenkin suositeltavaa tutkia yksi tai useampi sytotoksisuusindikaattori, sillä tämä voi auttaa tulkitsemaan havaintoja. Kun sytotoksisuudesta on selvää näyttöä, DNA:n liikkumisen lisääntymistä on tulkittava varovasti.

Useita erityyppisiä sytotoksisuusmittauksia on ehdotettu. Histopatologisia muutoksia pidetään asiaankuuluvana tapana mitata kudoksen toksisuutta. DNA:n siirtymisen lisääntymiseen on liitetty tulehduksen, solujen infiltraation, apoptoottisten tai nekroottisten muutosten kaltaisia löydöksiä, mutta kuten JaCVAMin validointikoe (12) osoitti, saatavana ei ole ehdotonta luetteloa histopatologisista muutoksista, jotka liittyisivät aina DNA:n siirtymisen lisääntymiseen. Muutokset kliinisissä kemiallisissa mittauksissa (esimerkiksi AST, ALT) voivat myös tarjota hyödyllistä tietoa kudosvauriosta, ja ylimääräisiä indikaattoreita, kuten kaspaasiaktivaatiota, TUNEL-värjäystä, Annexin V -värjäystä jne., voidaan myös tarkastella. Saatavilla on kuitenkin vain rajallinen määrä julkaistuja tietoja, joiden mukaan jälkimmäistä olisi käytetty *in vivo* -tutkimuksissa Osa näistä tiedoista ei välttämättä ole erityisen luotettavia.

Siilit (eli pilvet tai haamusolut) ovat soluja, joilla on mikroskooppikuvassa pieni tai olematon ydin ja suuri hajanainen pyrstö; niitä pidetään pahasti vaurioituneina soluina, vaikka niiden etiologiasta ei olekaan varmuutta (ks. lisäys 3). Niiden ulkonäön vuoksi pyrstön DNA-pitoisuuden (%) mittaaminen kuva-analyysilla on epäluotettavaa, ja siksi siilejä pitäisi arvioida erikseen. Siilien esiintyminen on pantava merkille ja raportoitava, ja niiden määrän merkittävää kasvua, jonka ajatellaan johtuvan testikemikaalista, on tutkittava ja tulkittava varoen. Tieto testikemikaalien potentiaalisesta vaikutustavasta saattaa auttaa tällaisissa pohdinnoissa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Eläin on koeyksikkö, ja siksi sekä yksittäisen eläimen tiedot että tulosyhteenveto olisi esitettävä taulukkomuodossa. Tietojen hierarkkisen luonteen vuoksi suositellaan, että kunkin näytelasin osalta määritetään pyrstön DNA-pitoisuuden (%) mediaani ja että kunkin eläimen osalta lasketaan mediaanien keskiarvo (12). Sitten lasketaan yksittäisen eläimen keskiarvojen keskiarvo, jonka pohjalta saadaan ryhmän keskiarvo. Kaikki nämä arvot on kirjattava raporttiin. Vaihtoehtoisia lähestymistapoja (ks. 53 kohta) voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti ja tilastollisesti perusteltua. Tilastoanalyysiin voidaan käyttää useita eri lähestymistapoja (58) (59) (60) (61). Käytettäviä tilastollisia menetelmiä valittaessa huomioon pitäisi ottaa tarve muuntaa tietoja (esimerkiksi log tai neliöjuuri) ja/tai lisätä pieni luku (esimerkiksi 0,001) kaikkiin arvoihin (jopa muihin kuin nolla-arvoihin) solujen nolla-arvojen vaikutusten minimoimiseksi, kuten edellä mainituissa kirjallisuusviitteissä on todettu. Yksityiskohtaiset tiedot käsittelyn ja sukupuolen keskinäisen vaikutuksen analysoinnista (molempia sukupuolia käytettäessä) sekä sen jälkeisestä tietojen analysoinnista (kun eroja havaitaan tai niitä ei havaita) esitetään liitteessä 2. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä merkeistä pitäisi myös raportoida.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyysperusteet ovat seuraavat:

a. Samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan voitavan lisätä laboratorion aiempaan negatiivisten kontrollien tietokantaan kohdassa 16 kuvatulla tavalla.

b. Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 29 kohta) pitäisi tuottaa vasteita, jotka vastaavat aiemmassa positiivisten kontrollien tietokannassa olevia vasteita, ja saada aikaan tilastollisesti merkitsevä kasvu samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin nähden.

c. Soluja ja annoksia on analysoitu riittävät määrät (52 ja 36–38 kohta).

d. Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat kohdassa 36 kuvattuja.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, jos

a. ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

b. kasvu riippuu annoksesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c. mikä tahansa tuloksista on aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella tietyn lajin, kantaja-aineen, reitin, kudoksen ja annostelutavan osalta.

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa DNA:n säikeiden katkeamista testijärjestelmässä tutkituissa kudoksissa. Jos kriteereistä täyttyy vain yksi tai kaksi, ks. 62 kohta.

Jos kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaalia pidetään selvästi negatiivisena, jos

a. mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. kasvu ei riipu pitoisuudesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c. kaikki tulokset ovat aiemman negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä tietyn lajin, kantaja-aineen, reitin, kudoksen ja annostelutavan osalta

d. on saatu suoraa tai välillistä näyttöä kohdekudoksen/-kudosten altistumisesta tai toksisuudesta kohdekudoksel-le/-kudoksille.

Tällöin katsotaan, että testikemikaali ei kykene aiheuttamaan DNA-säikeiden katkeamista tässä testijärjestelmässä tutkituissa kudoksissa.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen (eli jos kaikki 59 tai 60 kohdassa luetellut perusteet eivät täyty), tuloksen biologisen merkityksellisyyden määrittämiseksi asiantuntijan pitäisi arvioida tietoja ja/tai pitäisi tehdä lisätutkimuksia, jos se on tieteellisesti perusteltua. Ylimääräisten solujen arvioinnista (tarvittaessa) tai kokeen toistamisesta mahdollisesti optimoiduissa olosuhteissa (esimerkiksi annosväli, muut annostelureitit, muut näytteenottoajat tai muut kudokset) voisi olla hyötyä.

Päätelmää positiivisuudesta tai negatiivisuudesta ei joissain erittäin harvoissa tapauksissa voida tehdä tietojen pohjalta edes lisätutkimusten jälkeen. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

Positiivisen tai epäselvän tuloksen biologisen merkityksellisyyden arviointi vaatii tietoa sytotoksisuudesta kohdekudoksessa (ks. 54–55 kohta). Kun sytotoksisuudesta on selvää näyttöä ja havainnot ovat positiivisia tai epäselviä, tutkimus on katsottava genotoksisuuden osalta epäselväksi, ellei saatavana ole riittävästi tietoa, joka tukee lopullisen johtopäätöksen tekemistä. Jos tutkimuksen tulos on negatiivinen ja toksisuudesta on merkkejä kaikilla testatuilla annoksilla, lisätutkimusten tekeminen ei-toksisilla annoksilla saattaa olla suositeltavaa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa.

Yhdestä aineosasta koostuva aine:

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useammasta aineosasta koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet sekä seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin/kantaja-aine:

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— annosformulaatioiden valmistelu

— formulaatioiden analyyttiset määritelmät (esimerkiksi stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet).

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta sekä tieteelliset ja eettiset perustelut sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto, virikkeet jne.

— eläinten yksilöllinen paino testin alussa ja lopussa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset (jos sellainen on tehty)

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— antotavan valintaperusteet

— injektiokohta (tutkimuksissa, joissa annostelu tapahtuu ihonalaisesti tai suonensisäisesti)

— näytteiden valmistelumenetelmät, jos ne ovat saatavana, histopatologiset analyysit erityisesti positiivisen komeettavasteen antavan kemikaalin osalta

— kudoksen valintaperusteet

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali välittyi kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot käsittely- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille (esimerkiksi toksikokineettiset tiedot, jos niitä on saatavana)

— kivunlievitysmenetelmä, analgesia

— lopettamistapa

— kudosten eristämis- ja säilömismenetelmät

— yhden solun/tuman suspension valmistamismenetelmät

— kaikkien reagenssien lähde ja eränumerot (jos mahdollista)

— sytotoksisuuden arviointimenetelmät

— elektroforeesiolosuhteet

— käytetyt värjäystekniikat

— komeettojen arviointi- ja mittausmenetelmät.

Tulokset:

— yleiset kliiniset havainnot, jos sellaisia on, ennen testijaksoa ja sen ajalta kustakin eläimestä

— näyttö sytotoksisuudesta, jos tutkimus on tehty

— yli viikon tutkimuksista: yksittäisten eläinten painot tutkimuksen aikana, mukaan lukien painon vaihteluväli, keskiarvo ja normaalijakauma kunkin ryhmän osalta ruoan kulutus

— annos-vastesuhde, kun se on ilmeinen

— kunkin kudoksen/eläimen osalta pyrstön DNA-pitoisuus (%) kunkin kudoksen/eläimen osalta, pyrstön DNA-pitoisuus (%) (tai muut toimenpiteet, jos sellaisia on valittu) ja mediaani näytelevyä kohti, eläinkohtaiset keskiarvot ja ryhmäkohtaiset keskiarvot

— rinnakkaiset ja aikaisemmat negatiivista kontrollia koskevat tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot/mediaanit ja keskihajonta kunkin arvioidun kudoksen osalta

— rinnakkaiset ja aikaisemmat positiivisilla kontrolleilla saadut tulokset

— muiden kudosten kuin maksan osalta annos-vastekäyrä positiivista kontrollia käytettäessä. Nämä voivat olla peräisin tiedoista, jotka on kerätty pätevyyden osoittamisen aikana (ks. 16–17 kohta), ja niiden lisäksi pitäisi esittää perustelut, jotka sisältävät viittaukset ajankohtaiseen kirjallisuuteen, jotta voidaan arvioida suuruusluokan asianmukaisuutta ja kontrollivasteiden hajanaisuutta kyseisessä kudoksessa

— tilastolliset analyysit ja käytetyt menetelmät sekä perusteet, joiden perusteella vaste katsotaan positiiviseksi, negatiiviseksi tai epäselväksi

— ns. siilien esiintymistiheys kussakin ryhmässä ja eläimessä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

Viitteet

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, s. 114–32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, s. 245–54.

(3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, s. 31–5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 143–63.

(5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 233–40.

(6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, s. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, s. 47–63.

(8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 206–21.

(9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, s. 184–91.

(10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, s. 40–69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, s. 86–94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, s. 207–14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, s. 249–61.

(16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, s. 108–20.

(17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, s. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 187–99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, s. 7–19.

(20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, s. 149–62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 621–3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, s. 51–9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, s. 28–41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,Vol. 393(1–2), 175–8;

(25) Toyoizumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, s. 175–80.

(26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, s. 240–9.

(27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1–2, s. 26–30.

(28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1–2, s. 51–9.

(29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, s. 31–5.

(30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, s. 486–500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, s. 629–799.

(32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, s. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, s. 3–12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, s. 275–282.

(35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, s. 443–451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, s. 167–72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 196–201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 165–81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, s. 267–282.

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1–2), s. 7–16.

(41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, s. 31–5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, s. 53–64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, s. 689–95.

(44) Møller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 109–11.

(45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 113–23.

(46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, s. 41–45.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Tässä liitteessä oleva B.8 luku: *Subakuutti toksisuus hengityksen kautta: 28-päiväinen tutkimus.*

(51) Tässä liitteessä oleva B.29 luku: *Subkrooninen toksisuus hengitysteiden kautta: 90-päiväinen tutkimus.*

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2–3, s. 141–45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, s. 35–41.

(54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, s. 50–4.

(56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, s.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, s. 109–19.

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, s. 167–75.

(60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, s. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 171–82.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Emäksinen yhden solun geelielektroforeesi: Herkkä tekniikka, jolla havaitaan primaarinen DNA-vaurio yksittäisessä solussa/tumassa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Komeetta: Komeettaa muistuttava muoto, jonka nukleoidit saavat sen jälkeen, kun ne on altistettu yhdelle elektroforeesikentälle: tuma muodostaa ytimen, ja pyrstö muodostuu DNA:sta, joka kulkeutuu ulos tumasta sähkökentässä.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Kriittinen muuttuja/parametri: Protokollan muuttuja, jossa tapahtuvalla pienellä muutoksella voi olla suuri vaikutus kokeen lopputulokseen. Kriittiset muuttujat voivat olla kudoskohtaisia. Kriittisiä muuttujia ei pidä muuttaa varsinkaan kokeessa ottamatta huomioon sitä, miten muutos muuttaa kokeessa saatavaa vastetta, niin kuin esimerkiksi positiivisten ja negatiivisten kontrollien suuruusluokka ja vaihtelu osoittavat. Testiraportissa pitäisi luetella kokeen aikana tehdyt kriittisten muuttujien muutokset tai muutoksia pitäisi verrata laboratorion standardi-protokollaan ja kullekin muutokselle pitäisi esittää perustelut.

Pyrstön koko tai pyrstön DNA-pitoisuus (%): Suhteutuu komeetan pyrstön kokoon, joka puolestaan suhteutuu kokonaiskokoon (ydin ja pyrstö). Kertoo DNA:n hajoamisasteesta ja ilmoitetaan prosentteina.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLIEROJEN MÄÄRITTÄMISEKSI *IN VIVO* -KOMEETTAKOKEESSA:

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä koemallissa testataan vähintään viisi urosta ja viisi naarasta kullakin pitoisuudella, minkä vuoksi mallissa käytetään vähintään 40:tä eläintä (20:tä urosta ja 20:tä naarasta, joihin lisätään asiaankuuluvat positiiviset kontrollit.)

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisemmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuus ovat päävaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Analyysissa jaotellaan tietojen vaihtelu sukupuolten väliseksi vaihteluksi, pitoisuuksien väliseksi vaihteluksi sekä vaihteluksi, joka liittyy sukupuolten ja pitoisuuksien yhdysvaikutukseen. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiivisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on laadittu monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä. Joissain annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York. John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka valitsevat mallinnuslähestymistavan ja esimerkiksi käyttävät yleisiä lineaarisia malleja (*General Linear Models*, GLM), saattavat lähestyä analyysia erilaisella mutta vastaavalla tavalla mutta eivät välttämättä luo perinteistä ANOVA-taulukkoa, joka on perua tietokoneita edeltävänä aikana kehitetyistä algoritmeihin perustuvista tilastolaskennan lähestymistavoista.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

Lisäys 3

KOKEEN NYKYISET RAJOITUKSET

Tämänhetkisen tietotason vuoksi *in vivo* -komeettakokeeseen liittyy useita rajoituksia. Nämä rajoitukset odotettavasti vähenevät tai supistuvat, kun kokeen käytöstä saadaan lisää kokemusta ja sääntelyllä voidaan vastata turvallisuuskysymyksiin.

1. Tietyntyyppiset DNA-vauriot voivat olla lyhytaikaisia eli korjaantua liian nopeasti ollakseen havaittavissa, kun viimeisestä annoksesta on kulunut 24 tuntia tai enemmän. Lyhytaikaisten vaurioiden tyypeistä ja tällaisia vaurioita todennäköisesti aiheuttavista kemikaaleista ei ole luetteloa, eikä tiedetä, millä aikavälillä tällainen vahinkotyyppi on havaittavissa. Optimaalinen näytteenottoaika voi olla myös kemikaali- tai reittikohtainen, ja näytteenottoajat pitäisikin määrittää kineettisten tietojen pohjalta (esimerkiksi aika, T_{max}, jossa saavutetaan huippupitoisuus plasmassa tai kudoksessa), kun tällaisia tietoja on saatavana. Useimmissa validointitutkimuksissa, jotka tukevat tätä testimetodia, määritetään ruumiinavausajankohdan olevan 2–3 tuntia viimeisen annoksen jälkeen. Julkaistussa kirjallisuudessa useimmissa tutkimuksissa viimeinen annos on annettu 2–6 tuntia ennen eläimen lopettamista. Siksi näiden kokemusten pohjalta testimenetelmässä suositellaan, että muuhun viittaavien tietojen puuttuessa viimeinen annos pitäisi antaa määriteltynä ajankohtana 2–6 tuntia ennen ruumiinavausta.

2. Missään tutkimuksessa ei tarkastella sitä, miten herkästi testi havaitsee lyhytaikaiset DNA-vauriot sen mukaan, onko annos on annettu ruoan tai juomaveden mukana vai ruokintaletkun kautta. Ruoan ja juomaveden kautta annetun annoksen on havaittu aiheuttavan DNA-vaurioita, mutta sen sijaan tällaisia raportteja on suhteellisen vähän ruokintaletkun ja ihonalaisen annostelun osalta, vaikka näistä annostelutavoista on paljon enemmän kokemusta. Siten kokeen herkkyys saattaa olla heikompi sellaisten kemikaalien osalta, jotka aiheuttavat lyhtyaikaista vauriota ruoassa tai juomavedessä annettuina.

3. Muista kudoksista kuin maksasta ja mahalaukusta ei ole tehty laboratorioiden välisiä tutkimuksia, minkä vuoksi ei ole annettu suositusta siitä, miten muissa kudoksissa kuin maksassa saavutetaan herkkä ja toistettavissa oleva vaste, kuten odotetut positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit. Maksan osalta ei onnistuttu saamaan aikaan sopimusta negatiivisen kontrolliarvon alarajan asettamisesta.

4. Vaikka monet julkaisut osoittavatkin, että *in vitro* -sytotoksisuudella on häiritsevä vaikutus, tilanteesta *in vivo* on julkaistu hyvin vähän tietoa, minkä vuoksi yhtä ainutta sytotoksisuuden mittaa ei voida suositella. DNA:n siirtymisen lisääntymiseen on liitetty histopatologisten muutosten, kuten tulehduksen, solujen infiltraation, apoptoottisten tai nekroottisten muutosten kaltaisia löydöksiä, mutta kuten JaCVAMin validointikoe (OECD, 2014) osoitti, nämä muutokset eivät aina johda positiivisiin komeettahavaintoihin eikä saatavana siten ole ehdotonta luetteloa histopatologisista muutoksista, jotka liittyisivät aina DNA:n siirtymisen lisääntymiseen. Siilien (eli pilvien tai haamusolujen) on aiemmin esitetty viittaavan sytotoksisuuteen, mutta niiden etiologiasta ei ole kuitenkaan varmuutta. Olemassa on tietoja, jotka viittaavat siihen, että ne voivat johtua testikemikaaliin liittyvästä sytotoksisuudesta, mekaanisesta / entsyymin aiheuttamasta vahingosta, joka on saanut alkunsa näytteen valmistelun aikana (Guerard *et al.*, 2014), ja/tai testikemikaalin genotoksisuuden rajummasta vaikutuksesta. Muut tiedot näyttävät osoittavan, että ne johtuvat laajoista mutta mahdollisesti korjaantuvista DNA-vaurioista (Lorenzo *et al.*, 2013).

5. Kudoksia tai solujen tumia on onnistuttu pakastamaan myöhempää analyysia varten. Tällä on usein mitattavissa oleva vaikutus vasteeseen kantaja-aineen ja positiivisen kontrollin osalta (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Jos pakastusmenetelmiä käytetään, laboratorion pitäisi osoittaa pätevyytensä ja vahvistaa hyväksyttävät, alhaiset pyrstön DNA-pitoisuuden (%) vaihteluvälit kantaja-aineella käsiteltyjen eläinten kohdekudoksissa, sekä se, että positiivisia vasteita voidaan silti havaita. Kirjallisuudessa on kuvattu kudosten pakastamista eri menetelmin. Tällä hetkellä ei kuitenkaan ole yhteisymmärrystä siitä, miten kudoksia olisi parasta pakastaa ja sulattaa ja miten arvioidaan sitä, voiko mahdollisesti muuttunut vaste vaikuttaa testin herkkyyteen.

6. Viimeaikaisen työn valossa kriittisten muuttujien luettelon odotetaan lyhenevän ja kriittisten muuttujien parametrien tarkentuvan (Guerard *et al.*, 2014).

Viitteet

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, s. 114–21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 699–707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, s. 427–32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, s. 101–13."

16) Korvataan C osassa oleva C.13 luku seuraavasti:

"C.13 **Bioakkumulaatio kaloissa: Altistaminen veden ja ravinnon välityksellä**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 305 (2012). Testimenetelmän tarkistamisella on kaksi päätavoitetta. Ensinnäkin tavoitteena on yhdistää ravinnon välityksellä tapahtuvaa bioakkumulaatiota [1] koskeva testi hyvin niukkaliukoisten aineiden mahdollisen bioakkumulaation määrittämiseen. Toiseksi tavoitteena on luoda testimenetelmä, jossa käytetään mahdollisuuksien mukaan vähemmän kaloja, mikä parantaa eläinten hyvinvointia ja on myös kustannustehokkaampaa.

Konsolidoidun testimenetelmän C.13 (1) käyttöönoton jälkeen on testattu lukuisia aineita, joten sekä laboratorioilla että sääntelyviranomaisilla on nykyään huomattavasti enemmän kokemusta asiasta. Tämä on vakuuttanut eri tahot siitä, että testejä voidaan yksinkertaistaa tiettyjen perusteiden täyttyessä (ks. 88 kohta) ja että vaiheittainen lähestymistapa on mahdollinen. Kokemus on myös osoittanut, että erilaiset biologiset tekijät, kuten kasvu ja kalan rasvapitoisuus, voivat vaikuttaa merkittävästi testituloksiin, joten ne pitää tarvittaessa ottaa huomioon. Lisäksi on todettu, ettei hyvin niukkaliukoisten aineiden testaus ole välttämättä teknisesti mahdollista. Vesiympäristössä esiintyville hyvin niukkaliukoisille aineille altistuminen veden välityksellä ei myöskään välttämättä ole niin merkittävää kuin ravinnon välityksellä tapahtuva altistuminen. Näiden seikkojen perusteella on kehitetty testimenetelmä, jossa kalat altistetaan ravinnon välityksellä (ks. 7–14 kohta ja 97 kohdasta eteenpäin). Ravinnon välityksellä tehtävä altistustesti validoitiin (yhteistutkimuksessa) vuonna 2010 (51).

Tärkeimpiä muutoksia ovat seuraavat:

— Yhden testipitoisuuden testaamista voidaan pitää riittävänä, jos on todennäköistä, ettei biokertyvyystekijä (bioconcentration factor, BCF) ole riippuvainen testipitoisuudesta.

— Minimoitu vesialtistustesti, jossa näytteenottopisteiden määrä voidaan pitää vähäisenä, on mahdollinen tiettyjen perusteiden täyttyessä.

[1] Ks. liitteessä 1 annetut määritelmät ja yksiköt.

— Kalojen rasvapitoisuus olisi mitattava siten, että biokertyvyystekijä voidaan ilmaista viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

— Tasapainotilassa tehtävän biokertyvyystekijöiden arvioinnin rinnalla painotetaan (kun mahdollista) aiempaa enemmän kineettisen biokertyvyystekijän arviointia.

— Tietyille aineryhmille ehdotetaan ravinnon välityksellä tehtävää altistustestiä, jos sen katsotaan soveltuvan tarkoitukseen veden välityksellä tapahtuvaa altistustestiä paremmin.

— Kala pitäisi punnita siten, että kineettinen biokertyvyystekijä ($BCF_{k)}$ voidaan korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaisesti.

Ennen bioakkumulaatiotestin tekemistä testiaineesta on tiedettävä seuraavat asiat:

a) Analyysitekniikan herkkyys sekä testiaineen että mahdollisten metaboliittien kudos-, vesi- tai ravintopitoisuuksien mittaamiseksi (ks. 65 kohta).

b) Vesiliukoisuus [TM A.6; (2)] on määritettävä (arvioituun) liukoisuusalueeseen soveltuvalla menetelmällä, jotta saatava arvo olisi luotettava. Hydrofobisilla aineilla tällainen menetelmä on yleensä kolonnieluutiomenetelmä.

c) N-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin, K_{OW} [1] [TM A.8 (4), TM A.24 (5) ja TM A.23 (6)] tai muu sopiva jakaantumiskäyttäytymistä koskeva tieto (kuten rasvasorptiokerroin, K_{OC}) pitäisi määrittää (arvioituun) K_{OW}-alueeseen soveltuvalla menetelmällä, jotta saatava arvo olisi luotettava. Hydrofobisilla aineilla tämä menetelmä on yleensä hidassekoitusmenetelmä [TM A.23 (6)].

d) Aineen stabiilius vedessä (hydrolyysi) [TM C.7 (7)].

e) Aineen stabiilius ravinnossa (erityisesti silloin, kun testimenetelmänä on ravintoaltistus).

f) Testin säteilyolosuhteiden kannalta merkitykselliset tiedot valokemiallisesta muuntumisesta (8).

g) Pintajännitys (aineilla, joiden log K_{OW}:ta ei voida määrittää) [TM A.5 (9)].

h) Höyrypaine [TM A.4 (10)].

i) Tarvittaessa tiedot bioottisesta ja abioottisesta hajoamisesta vedessä, kuten (esimerkiksi) nopea biohajoavuus [TM C.4, osat II–VII(11), TM C.29 (12)].

j) Tiedot metaboliiteista: rakenne, log K_{OW}, muodostuminen ja hajoavuus tarvittaessa.

k) Hapon dissosiaatiovakio (pK_a) mahdollisesti ionisoituvilla aineilla. Testiveden pH-arvo on tarvittaessa säädettävä siten, että aine on testin aikana ionisoimattomassa muodossa, jos se on mahdollista käytettävillä kalalajeilla.

Riippumatta valitusta altistusmenetelmästä tai otanta-aikataulusta tämä testimenetelmä kuvaa prosessia, jonka avulla voidaan määrittää eri aineiden bioakkumulaatiopotentiaali kaloissa. Vaikka läpivirtausolosuhteissa suoritettu testaus on paras, puolistaattiset olosuhteet ovat hyväksyttäviä tiettyjen validiteettiperusteiden täyttyessä (ks. 24 ja 113 kohta). Ravinnon välityksellä tehtävä altistus ei edellytä läpivirtausjärjestelmää, jotta testiaineen pitoisuus vedessä pysyisi samana, mutta sen avulla voidaan ylläpitää liuenneen hapen pitoisuus sopivalla tasolla sekä varmistaa veden puhtaus ja mitätöidä esimerkiksi erilaisten eritteiden vaikutukset.

[1] Joskus käytetään myös lyhennettä P_{OW}; määritetään ravistuspullomenetelmällä TM A.8:ssa (3), HPLC-menetelmällä (nestekromatografia) TM A.24:ssä (4) ja hidassekoitusmenetelmällä TM A.23:ssa (5). Log K_{OW} -kertoimen määrittämisessä käytetään joskus myös kehitinkolonnimenetelmää. Tätä menetelmää on käytetty tutkimuksissa vähän. Tutkimusten kohteina ovat tällöin olleet etupäässä klooratut bifenyylit ja dibentsodioksiinit (esimerkiksi Li ja Doucette, 1993) (3). Mahdollisesti ionisoituvilla aineilla log K_{OW} -kertoimen pitäisi viitata ionisoitumattomaan muotoon.

Tässä kuvatussa testimenetelmässä annetaan riittävän tarkat ohjeet testin suorittamiseksi valitusta testimenetelmästä riippumatta, mutta koejärjestelyjä on mahdollista mukauttaa yksittäisten laboratorioiden erityisolosuhteiden ja testiaineiden vaihtelevien ominaisuuksien huomioimiseksi. Vesialtistustesti soveltuu parhaiten sellaisille stabiileille orgaanisille aineille, joiden log K_{OW} -arvo on 1,5–6,0 (13), mutta sitä voidaan käyttää myös erittäin hydrofobisten aineiden (joiden log K_{OW} on yli 6,0) testaamisessa, jos on mahdollista osoittaa, että testiaine on kokonaan liuennut ja sen pitoisuus vedessä on vakaa. Jos testiaineen vakaata pitoisuutta vedessä ei voida osoittaa, vesitutkimus ei ole hyvä menetelmä. Tällöin ainetta on testattava kaloissa ravinnon välityksellä (vaikkakin ravintoaltistustestin tulosten tulkinta ja käyttö saattavat riippua sovellettavasta säädöskehyksestä). Orgaanisilla aineilla, joiden log K_{OW} on noin 9,0, biokertyvyystekijä (BCF, josta käytetään joskus myös tunnusta K_B), biokertyvyystekijää voidaan arvioida alustavasti Bintein *et al.* -yhtälön avulla (14). Erittäin hydrofobisilla aineilla biokertyvyystekijän alustavassa arviossa saatu arvo voi olla korkeampi kuin laboratorio-olosuhteissa odotettu tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}). Näin on erityisesti silloin, kun alustavassa arviossa käytetään yksinkertaista lineaarista mallia. Bioakkumulaatiopotentiaalia kuvaavia muuttujia ovat muun muassa kertymävakio (k_1), poistumavakiot (kuten k_2), tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}), kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ja ravinnon biomagnifikaatiokerroin (BMF) ([1]).

Radioaktiivisten merkkiaineiden käyttö saattaa helpottaa vesi-, ravinto- ja kalanäytteiden analysointia, ja niitä voi käyttää sen arvioimiseksi, onko metaboliittien tunnistaminen ja kvantifiointi tarpeen. Jos mitataan vain radioaktiivisten jäämien kokonaismäärä (esim. polttamalla tai kudoksiin liuottamalla), BCF tai BMF perustuu perusaineen kokonaismäärään, mahdollisesti jäljellä oleviin metaboliitteihin sekä assimiloituneeseen hiileen. Radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään perustuva BCF- tai BMF-arvo ei siis ole välttämättä suoraan verrattavissa siihen BCF:ään tai BMF:ään, joka on johdettu pelkästään perusaineen spesifisestä kemiallisesta analyysistä. Erilaisia erotusmenetelmiä, kuten TLC, HPLC GC ([2]), voidaan käyttää ennen analyysia radioaktiivisia merkkiaineita soveltavissa tutkimuksissa perusaineeseen perustuvan BCF:n tai BMF:n määrittämiseksi. Erotustekniikoita käytettäessä on tunnistettava ja kvantifioitava perusaine ja merkitykselliset metaboliitit ([3]) (ks. 65 kohta), jos BCF tai BMF on tarkoitus määrittää kalojen perusainepitoisuuden perusteella radioaktiivisten jäämien kokonaismäärän sijasta. Kalojen aineenvaihduntaa koskeva tutkimus tai *in vivo* -distribuutiotesti on myös mahdollista liittää bioakkumulaatiotutkimukseen analysoimalla ja tunnistamalla kudoksissa esiintyvät jäämät. Mahdollista metaboloitumista voidaan ennustaa tarkoitukseen soveltuvilla työkaluilla (kuten OECD:n QSAR-työkalupakki (15) sekä alkuperäisvalmisteita koskevat QSAR-ohjelmat).

Siitä, tehdäänkö altistustesti veden vai ravinnon välityksellä, pitäisi päättää 3 kohdassa kuvattujen tekijöiden sekä sovellettavan säädöskehyksen perusteella. Esimerkiksi aineilla, joiden log K_{OW} -arvo on korkea mutta joiden vesiliukoisuus on kuitenkin arvioitavissa käytettävissä olevien analyysitekniikoiden herkkyyden ansiosta, pitäisi ensisijaisesti valita vesialtistustesti. On kuitenkin mahdollista, etteivät vesiliukoisuutta koskevat tiedot ole hydrofobisilla aineilla lopullisia. Näin ollen ennen testimenetelmän valitsemista pitäisi selvittää, onko mahdollista valmistaa vakaita ja mitattavissa olevia liuenneita vesipitoisuuksia (stabiilit emulsiot eivät ole sallittuja), joita voidaan käyttää veden välityksellä tehtävässä altistustutkimuksessa (16). Käytettävästä menetelmästä ei ole mahdollista antaa tarkkoja ohjeita vesiliukoisuuden ja oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen raja-arvojen perusteella, koska muut tekijät (kuten analyysitekniikat, hajoaminen ja imeytyminen) voivat vaikuttaa merkittävästi menetelmän soveltuvuuteen edellä esitetyistä syistä. Log K_{OW} -arvon ollessa yli 5 ja vesiliukoisuuden alle ~0,01–0,1 mg/l aineen testaus vesialtistuksella voi olla hankalampaa.

Testimenetelmän valintaan mahdollisesti vaikuttavat muut tekijät on myös otettava huomioon. Niitä ovat esimerkiksi aineen mahdollinen imeytyminen testiastioihin ja -laitteisiin ja aineen stabiilius vesiliuoksessa verrattuna sen stabiiliuteen kalan ravinnossa (17) (18).

([1]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.
([2]) TLC: ohutkerroskromatografia; HPLC: nestekromatografia; GC: kaasukromatografia.
([3]) Joidenkin säädöskehysten mukaan metaboliittien analysointi voi olla pakollista, jos tietyt edellytykset täyttyvät (ks. 65 kohta).

Tietoa vastaavista käytännön seikoista saattaa löytyä aiemmin tehdyistä vesitutkimuksista. Lisätietoa bioakkumulaatiotutkimusten tehokkuuden arvioinnista löytyy aihetta käsittelevästä kirjallisuudesta (esim. (19)).

Tätä menetelmää suositaan testiaineen bioakkumulaatiopotentiaalin määrittämisessä aineilla, joilla liukoisuus tai vesipitoisuuden ylläpitäminen ja pitoisuuksien analysointi ei hankaloita vesialtistusmenetelmän toteutusta. Joka tapauksessa olisi varmistettava, että vesialtistuksessa käytettävät pitoisuudet vastaavat väliaineen vesiliukoisuusaluetta. Liuenneiden testiaineiden pitoisuuksien ylläpitämiseksi stabiileina voidaan käyttää eri menetelmiä, kuten kantaliuosten tai passiivisten annostelujärjestelmien käyttöä (esimerkiksi kolonnieluutiomenetelmä), kunhan voidaan osoittaa, että pitoisuudet voidaan pitää stabiileina eivätkä testiaineet muutu kohdassa 27 annettuihin suosituksiin nähden.

Erittäin hydrofobisilla aineilla (log K_{OW} > 5 ja liukoisuus alle ~ 0,01–0,1 mg/l) testaaminen vesialtistuksessa voi olla hankalampaa. Ongelmia saattaa seurata siitä, ettei vesipitoisuutta voida ylläpitää riittävän vakiona (esimerkiksi siksi, että aine imeytyy altistussäiliöiden lasiin tai kertyy kaloihin nopeasti) tai käytettävien vesipitoisuuksien taso on yhtä alhainen tai alhaisempi kuin kvantifioinnin analysointiraja ([1]). Tällaisilla erittäin hydrofobisilla aineilla on suositeltavaa käyttää ravinnon välityksellä tehtävää testiä edellyttäen, että testissä noudatetaan sovellettavaa säädöskehystä ja huomioidaan riskinarviointiin liittyvät tarpeet.

Pinta-aktiivisilla aineilla on arvioitava, voidaanko biokertyvyys testata vedessä ottaen huomioon aineen ominaisuudet. Jos se ei ole mahdollista, ravinnon välityksellä tehtävä tutkimus on todennäköisemmin parempi vaihtoehto Pinta-aktiiviset aineet ovat aineita, jotka alentavat kahden nesteen välistä rajapintajännitystä. Ne ovat luonteeltaan amfifiilisia (eli niissä on sekä hydrofiilinen että hydrofobinen osa), minkä takia ne kertyvät erilaisiin rajapintoihin, kuten veden ja ilman väliseen rajapintaan, veden ja ravinnon väliseen rajapintaan sekä lasiseinämiin. Tästä johtuen niiden vesipitoisuutta ei voida määrittää.

Ravinnon välityksellä tehtävässä testissä voidaan kiertää osa altistukseen liittyvistä näkökohdista, kun on kyse monimutkaisista seoksista, joiden ainesosat liukenevat veteen eri tavoin. Tällöin vertailtavissa oleva altistuminen kaikille seoksen ainesosille on todennäköisempää kuin veden välityksellä tehtävässä menetelmässä (ks. (20)).

On huomattava, että ravinnon välityksellä tehtävässä testissä saadaan ennemminkin ravinnon biomagnifikaatiokerroin (BMF) kuin biokertyvyystekijä (BCF) ([2]). Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) voidaan arvioida erilaisin menetelmin ravinnon välityksellä tehtävässä tutkimuksessa saatujen tietojen perusteella (kuten esitetään liitteessä 8), mutta niitä on käytettävä varovaisesti. Yleensä kyseisillä menetelmillä voidaan selvittää ensimmäisen asteen kinetiikka ja ne soveltuvat vain tietyille ainesosaryhmille. On epätodennäköistä, että niitä voitaisiin soveltaa pinta-aktiivisiin aineisiin (ks. 12 kohta).

Minimoitua vesialtistustestiä, jossa eläinten ja/tai resurssien määrä pidetään pienempänä vähentämällä näytteenottopisteiden määrää (ks. 83 kohta ja siitä eteenpäin), pitäisi käyttää vain sellaisilla aineilla, joilla on syytä olettaa, että kertymä ja poistuma noudattavat suurin piirtein ensimmäisen asteen kinetiikkaa (eli kyse on yleensä ionisoitumattomista orgaanisista aineista, ks. 88 kohta).

([1]) Kertymävaiheen aikana vedestä mitattujen pitoisuuksien pitäisi yleensä olla vähintään yhden suuruusluokan korkeampia kuin kvantifiointiraja, jotta kaloihin kertyneestä aineesta saadaan tutkimuksen poistumavaiheessa määritettyä useampi kuin yksi puoliintumisaika.

([2]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.

C.13 – I: **Biokertyvyyden testaaminen kaloilla vesialtistuksessa**

TESTIN PERIAATE

Testissä on kaksi vaihetta: altistusvaihe (kertymävaihe) ja altistuksen jälkeinen vaihe (poistumavaihe). Kertymävaiheen aikana ryhmä tietyn kalalajin yksilöitä altistetaan testiaineelle yhdessä tai useammassa valitussa pitoisuudessa testiaineen ominaisuuksista riippuen (ks. 49 kohta). Kalat siirretään tämän jälkeen poistumavaihetta varten väliaineeseen, jossa ei ole testiainetta. Kokeessa on aina oltava poistumavaihe, paitsi jos aineen kertyminen kertymisvaiheen aikana on mitättömän pieni. Testiaineen pitoisuutta kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa) seurataan testin molempien vaiheiden aikana. Altistusryhmän lisäksi kalojen vertailuryhmää pidetään samanlaisissa olosuhteissa (mutta ilman testiainetta), jotta biokertyvyyskokeessa mahdollisesti havaittavia haitallisia vaikutuksia voidaan verrata vertailukelpoiseen vertailuryhmään ja saadaan testiaineen taustapitoisuudet ([1]).

Vesialtistuksessa kertymävaihe kestää tavallisesti 28 vuorokautta. Kertymävaiheen kestoa voidaan tarvittaessa pidentää (ks. 18 kohta) tai sitä voidaan lyhentää, jos ilmenee, että tasapainotila on saavutettu nopeammin (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt). Kertymävaiheen kestoa ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittavaa aikaa voidaan ennustaa liitteessä 5 esitettyjen yhtälöiden avulla. Poistumavaihe alkaa, kun kaloja ei enää altisteta testiaineelle ja ne siirretään puhtaaseen astiaan samaan väliaineeseen, jossa ei kuitenkaan ole testiainetta. Biokertyvyystekijä lasketaan mahdollisuuksien mukaan sekä kalassa olevan pitoisuuden (C_f) ja vedessä olevan pitoisuuden suhteena (C_w) tasapainotilassa (BCF_{SS}; ks. lisäys 1, määritelmä) että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K; ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt), joka arvioidaan kertymävakion (k1) ja poistuma-vakion (k2) suhteena, kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa ([2]).

Jos tasapainotilaa ei saavuteta 28 vuorokauden kuluessa, voidaan joko laskea BCF käyttämällä kineettistä lähestymistapaa (ks. 38 kohta) tai pidentää kertymävaihetta. Jos tasapainotilan saavuttaminen edellyttää kohtuuttoman pitkää kertymävaihetta (ks. 37 ja 38 kohta, liite 5), on suositeltavampaa käyttää kineettistä lähestymistapaa. Erittäin hydrofobisilla aineilla pitäisi vaihtoehtoisesti harkita ravintoaltistustestin toteuttamista ([3]) edellyttäen, että sovellettava säädöskehys sallii tämän.

Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään monimutkaisempia malleja), biokertyvyystekijä (tasapainotilan ja/tai kineettinen) ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan mallista, joka parhaiten kuvaa testiaineen mitattuja pitoisuuksia kaloissa ja vedessä (ks. liite 5).

Koska kalan massa kasvaa testin aikana, testiaineen pitoisuus kasvavassa kalassa laskee (niin kutsuttu kasvun aiheuttama liukeneminen). Näin ollen kineettinen BCF arvioidaan liian alhaiseksi, jollei sitä korjata kasvun mukaisesti (ks. 72 ja 73 kohta).

BCF perustuu aineen kokonaispitoisuuteen kalassa (tässä huomioidaan kalan kokonaistuorepaino). Erityisistä syistä voidaan kuitenkin käyttää tiettyjä kudoksia tai elimiä (esim. lihas ja maksa), jos kala on riittävän suurikokoinen tai se voidaan jakaa syötävään (filee) ja syömäkelvottomaan (sisälmykset) osaan. Koska monien orgaanisten aineiden biokertyvyyspotentiaalin ja hydrofobisuuden välillä on selvä suhde, myös testattavan kalan rasvapitoisuuden ja kyseisten aineiden havaitun biokertyvyyden välillä on vastaava suhde. Jotta tämän muuttujan merkitystä testituloksissa voitaisiin pienentää aineilla, joiden lipofiilisyys on korkea (joiden log K_{OW} > 3), biokertyvyys pitäisi ilmaista normalisoituna viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (kalan kokonaistuorepainoon verrattuna) suoraan tutkimuksesta johdetun biokertyvyyden ohella. Tämä on tarpeen, jotta eri aineita ja/tai testilajeja koskevia tuloksia voidaan verrata keskenään. Viiden prosentin rasvapitoisuutta on käytetty laajalti, koska se edustaa tässä testimenetelmässä yleisesti käytettävien kalojen keskimääräistä rasvapitoisuutta (21).

([1]) Useimmilla testiaineilla niitä ei pitäisi ideaalitilanteessa löytyä kontrollivedestä. Taustapitoisuuksilla pitäisi olla merkitystä vain luonnossa esiintyvien materiaalien (kuten joidenkin metallien) ja kaikkialla ympäristössä olevien aineiden kannalta.

([2]) Jos reaktio ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. liitteessä 5 annetut viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijoilta.

([3]) Alhainen altistuspitoisuus voi rajoittaa kertymää, koska biokertyvyystestissä vesiliukoisuus on heikko, kun taas ravintotestissä voidaan saavuttaa korkeampi altistuspitoisuus.

TESTIAINEEN TIEDOT

Johdannossa (3 kohta) mainittujen testiaineen ominaisuuksien lisäksi muita tarvittavia tietoja ovat aineen toksisuus testissä käytettävälle kalalajille, mieluiten asymptoottinen (ajasta riippumaton) LC_{50}, ja/tai pitkäkestoisten kalakokeiden perusteella arvioitu toksisuus (esim. TM C.47 (22), TM C.15 (23) ja TM C.14 (24)).

Testiliuoksissa ja biologisessa aineksessa olevan aineen kvantifioimiseksi pitäisi olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan, sekä näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat yksityiskohtaiset tiedot. Testiaineen kvantifiointiraja sekä vedessä että kalan kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Jos testissä käytetään radioaktiivista merkkiainetta, sen pitäisi olla mahdollisimman puhdasta (mieluiten > 98 %). Lisäksi on tunnettava epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus.

TESTIN VALIDITEETTI

Testi on luotettava, jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

Veden lämpötilan vaihtelu on alle ± 2 °C, koska suuret poikkeamat voivat vaikuttaa kertymisen ja poistuman kannalta olennaisiin biologisiin muuttujiin ja aiheuttaa eläimille stressiä.

Liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästymisarvosta.

Testiaineen pitoisuus testauskammiossa pidetään 20 prosentin rajoissa kertymävaiheessa mitattujen arvojen keskiarvosta.

Testiaineen pitoisuus ei ylitä sen vesiliukoisuusrajaa ottaen huomioon vaikutuksen, joka testivedellä voi olla tosiasialliseen liukoisuuteen ([1]).

Kuolleisuus tai muut haittavaikutukset tai sairaudet sekä vertailu- että käsittelyryhmän kaloissa on alle 10 prosenttia testin lopussa; jos koe kestää useita viikkoja tai kuukausia, kuolleisuuden tai muiden haittavaikutusten olisi oltava molemmissa ryhmissä alle 5 prosenttia kuukautta kohti, eikä se saisi kaikkiaan olla enemmän kuin 30 prosenttia. Merkittävä ero testi- ja vertailukalojen keskimääräisessä kasvussa saattaa olla merkki testiaineen toksisuudesta.

VERTAILUAINEET

Testimenettelyn tarkistamisessa (esimerkiksi silloin, kun laboratoriolla ei ole aiempaa kokemusta kyseisestä testistä tai testausolosuhteet ovat muuttuneet) on hyödyllistä käyttää vertailuaineita, joiden biokertyvyyspotentiaali tunnetaan ja joiden metaboloituminen tiedetään vähäiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Laitteistossa – tai missään sen osissa – ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liueta, sorboitua tai uuttua ja vaikuttaa kaloihin haitallisesti. Testeissä voidaan käyttää tavallisia laatikon- tai lieriönmuotoisia säiliöitä, jotka on tehty kemiallisesti inertistä aineesta ja jotka ovat täyttönopeuden perusteella kooltaan sopivia (ks. 43 kohta). Pehmeää muoviletkua pitäisi käyttää mahdollisimman vähän. Ennemminkin pitäisi käyttää politetrafluorieteenistä, ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettua putkea/letkua. Kokemus on osoittanut, että testiaineilla, joilla on korkea imeytymiskerroin, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet pitäisi hävittää käytön jälkeen. On suositeltavaa altistaa testijärjestelmät tutkimuksessa käytettävälle testiainepitoisuudelle niin kauan kuin on tarpeen sen osoittamiseksi, että altistuspitoisuus pysyy stabiilina, ennen kuin testiorganismit syötetään niihin.

([1]) Useammasta ainesosasta koostuvien aineiden, koostumukseltaan tuntemattomien tai vaihtelevien aineiden, kompleksin reaktiotuotteen tai biologisen materiaalin (UCVB) sekä seosten testauksessa sopiva altistuspitoisuus on määritettävä kunkin olennaisen ainesosan vesiliukoisuuden perusteella.

Vesi

Testissä käytetään yleensä luonnon vettä, jonka on oltava pilaantumatonta ja laadultaan tasaista. Synteettinen vesi (eli demineralisoitu vesi, johon on lisätty tunnettu määrä tiettyjä ravinteita) voi kuitenkin varmistaa tasalaatuisuuden paremmin ajan kuluessa. Laimennusvesi, joka sekoitetaan testiaineen kanssa ennen sen syöttämistä testiastiaan (ks. 30 kohta), pitäisi olla niin hyvälaatuista, että valitut kalalajit elävät siinä totuttamisvaiheen ja testin ajan ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä ilmenee mitään poikkeavaa. Olisi ihanteellista pystyä osoittamaan, että koelaji elää, kasvaa ja lisääntyy laimennusvedessä (esim. laboratoriokasvatuksessa tai koko sukupolven kierron käsittävässä toksisuustestissä). Laimennusvedestä on tiedettävä ainakin sen pH, kovuus, kiinteiden aineiden kokonaispitoisuus, orgaanisissa yhdisteissä olevan hiilen kokonaismäärä (TOC ([1])) ja mieluiten myös ammonium-ioni- ja nitriittipitoisuus sekä emäksisyys ja merieliöiden osalta suolapitoisuus. Kalojen hyvinvoinnille tärkeitä tekijöitä ei tunneta täysin, mutta lisäyksessä 2 annetaan suositeltavat enimmäispitoisuudet useille makean ja meriveden testivesien muuttujille.

Laimennusveden laadun on pysyttävä tasaisena testin ajan. Sen pH-arvo voi olla testin alkaessa 6,0–8,5, mutta vaihteluväli ei saa olla tietyn testin ajan suurempi kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testiainetta) tai vaikuta haitallisesti kalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava analysointia varten säännöllisin väliajoin ja vähintään testin alussa ja lopussa. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, ja SO_4^{2-}), torjuntaaineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos laimennusveden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esimerkiksi kuuden kuukauden välein).

Luonnosta peräisin olevien hiukkasten samoin kuin orgaanisen hiilen kokonaismäärän laimennusvedessä olisi oltava mahdollisimman alhainen, jotta testiaine ei absorboituisi orgaaniseen aineeseen, mikä saattaisi vähentää sen biologista hyötyosuutta ja johtaa samalla siihen, että BCF arvioitaisiin liian pieneksi. Suurin hyväksyttävä arvo on 5 mg/l hiukkasille (kuiva-aine, joka ei läpäise 0,45 µm:n suodatinta) ja 2 mg/l orgaanisen hiilen kokonaismäärälle (ks. lisäys 2). Laimennusvesi on tarvittaessa suodatettava ennen käyttöä. Testattavista kaloista (ulosteista) ja ruoanjätteistä peräisin olevan orgaanisen hiilen määrän pitäisi olla testivedessä mahdollisimman alhainen (ks. 46 kohta).

Testiliuokset

Testiaineesta tehdään kantaliuos, jonka pitoisuus on sopiva. Kantaliuos valmistetaan mieluiten joko sekoittamalla tai ravistelemalla testiaine laimennusveteen. Joissakin tapauksissa voi olla parempi käyttää kiinteän faasin desorptioannostelujärjestelmää. Liuottimien ja dispergointiaineiden (liuotusapuaineiden) käyttöä ei yleensä suositella (ks. (25)). Kyseisten aineiden käyttö voi kuitenkin joskus olla hyväksyttävää riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi, mutta niiden käyttö pitää kaikin tavoin pyrkiä pitämään mahdollisimman vähäisenä eikä niiden kriittistä misellipitoisuutta pitäisi ylittää (tarvittavilta osin). Hyväksyttäviä liuottimia ovat asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Dispergointiaineista käytössä ovat olleet Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Lopullisen testiaineen liuotinpitoisuuden pitäisi olla sama kaikissa käsittelyissä (riippumatta testiaineen pitoisuudesta), eikä sen pitäisi ylittää kyseiselle liuottimille määritettyä toksisuuden kynnysarvoa testiolosuhteissa. Suurin sallittu pitoisuus on 100 mg/l (tai 0,1 ml/l). On epätodennäköistä, että liuottimen pitoisuus muuttaisi testiaineen liuennutta maksimipitoisuutta väliaineessa, kun se on 100 mg/l (25). Liuottimen (samoin kuin testiaineen) osuus orgaanisen hiilen kokonaismäärästä testivedessä on tunnettava. Orgaanisen hiilen pitoisuus testiastioissa ei saa missään testivaiheessa ylittää testiaineesta ja mahdollisesti käytetystä liuotusaineesta tai liuotinapuaineesta ([2]) peräisin olevaa pitoisuutta yli 10 milligrammalla litraa kohti

([1]) TOC käsittää sekä hiukkasten muodostaman orgaanisen hiilen että liuenneen orgaanisen hiilen, eli TOC = POC + DOC.
([2]) Liuottimen tai liuotusapuaineen käyttöä ei yleensä suositella,. Jos niitä kuitenkin käytetään, niistä peräisin oleva orgaaninen hiili on laskettava yhteen testiaineesta peräisin olevan orgaanisen hiilen kanssa, jotta voidaan arvioida orgaanisen hiilen pitoisuus testiastioissa.

(± 20 prosenttia). Orgaanisen aineksen pitoisuus voi vaikuttaa merkittävästi siihen, minkä verran testiainetta liukenee vapaasti kaloilla tehtävän läpivirtaustestin aikana. Tämä koskee etenkin erittäin lipofiilisia aineita. Kiinteäfaasiuuton (ks. 60 kohta) avulla voidaan saada tärkeää tietoa sitoutuneiden ja vapaasti liuenneiden yhdisteiden suhteesta. Viimeksi mainitun katsotaan osoittavan aineen biologisen hyötyosuuden. Testiaineen pitoisuuden pitäisi olla väliaineessa testiaineen liukoisuuden raja-arvoa alhaisempi riippumatta siitä, käytetäänkö testissä liuotinta tai liuotusapuainetta. Nopeasti biohajoavia liuottimia käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa läpivirtaustesteissä ongelmia bakteerikasvuston takia. Jos kantaliuosta ei voida valmistaa ilman liuotusapuainetta, on mietittävä, onko vesialtistustutkimus todella parempi vaihtoehto kuin ravinnon välityksellä tehtävää altistus.

Läpivirtaustestissä on käytettävä järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää), joka annostelee ja laimentaa jatkuvasti testiaineen kantaliuosta, tai kiinteän faasin desorptioannostelujärjestelmää testipitoisuuksien annostelemiseksi testikammioihin. Testikammioiden veden pitäisi vaihtua mielellään ainakin viisi kertaa vuorokaudessa. Läpivirtausmalli on paras, mutta jos sitä ei voida käyttää (jos se esimerkiksi vaikuttaa haitallisesti testiorganismeihin), voidaan käyttää puolistaattista järjestelmää, mikäli validiteettiperusteet täyttyvät (ks. 24 kohta). Kantaliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava sekä 48 tuntia ennen testiä että vähintään kerran päivässä testin aikana. Tämän tarkistuksen yhteydessä mitataan myös läpivirtausnopeus kaikissa testikammioissa ja varmistetaan, ettei se vaihtele yli 20:tä prosenttia yhdessä kammiossa tai kammioiden välillä.

Lajin valinta

Tärkeitä perusteita lajin valinnassa ovat se, että lajia on helposti saatavilla, se, että lajia voi saada sopivan kokoisina yksilöinä, sekä se, että lajia voidaan helposti ylläpitää laboratoriossa. Muita perusteita kalalajin valitsemiselle voivat olla virkistyskäyttö, kaupallinen tai ekologinen merkitys sekä vertailukelpoinen herkkyys, onnistunut käyttö aikaisemmin ym. Suositeltavat testilajit luetellaan lisäyksessä 3. Muita lajeja voidaan käyttää, mutta testiprosessia on mahdollisesti mukautettava sopivien testiolosuhteiden varmistamiseksi. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen. Kun käytetään pienempiä kalalajeja, tasapainotila saavutetaan yleensä nopeammin. Tällöin saatetaan kuitenkin tarvita enemmän kaloja (suurempi otanta), jotta rasvapitoisuus ja testiaineen pitoisuus kaloissa voitaisiin määrittää asianmukaisesti. On myös mahdollista, että erot nuorten ja vanhojen kalojen soluhengitystasossa ja aineenvaihdunnassa estävät eri testeissä ja eri lajeilla saatujen tulosten vertaamisen. On huomattava, että kalalajien testaaminen nopean kasvun vaiheessa (nuorena) voi vaikeuttaa testitulosten tulkintaa.

Kalojen hoito (veden ja ravinnon välityksellä tehtävissä altistuksissa)

Kalojen kantapopulaatiota pitäisi totuttaa veteen vähintään kahden viikon ajan (ks. 28 kohta) testauslämpötilassa ja kaloja ruokkia riittävästi (ks. 45 kohta). Sekä veden että ravinnon pitäisi olla samantyyppistä kuin varsinaisessa testissä.

Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, jonka jälkeen noudatetaan seuraavia periaatteita:

— Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta, kaloja totutetaan vielä seitsemän päivää. Jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia toisen seitsemän päivän jakson aikana, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa, erä hyväksytään.

Testeissä käytettävissä kaloissa ei saa olla havaittavia tauteja tai poikkeavuuksia. Kuolleet kalat on hävitettävä. Kaloille ei saisi antaa mitään hoitoa sairauden takia testiä edeltävien kahden viikon aikana eikä testin aikana.

TESTIN SUORITTAMINEN

Alustava testi

Voi olla hyvä tehdä esikoe lopullisen testin olosuhteiden optimoimiseksi. Näin voidaan esimerkiksi valita testiaineen pitoisuus (pitoisuudet), määrittää kertymä- ja poistumavaiheen kesto tai arvioida, miten kattava testin pitäisi olla. Alustava testi on suunniteltava siten, että se antaa tarvittavat tiedot. Näin voidaan arvioida, riittääkö minimitesti BCF:n määrittämiseksi vai tarvitaanko kattava tutkimus (ks. 83–95 kohta, joissa käsitellään minimoitua testiä).

Altistusolosuhteet

Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen kesto voidaan ennustaa käytännön kokemuksen perusteella (esim. rakenteeltaan samankaltaisia aineita koskevien aiempien tutkimusten tai akkumulaatiotutkimusten perusteella) tai tietyistä kokemusperäisistä suhteista hyödyntämällä joko testiaineen vesiliukoisuutta tai oktanoli-vesi-jakaantumiskerrointa koskevia tietoja (edellyttäen, että kertymä noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa, ks. liite 5).

Kertymävaiheen on kestettävä 28 vuorokautta, paitsi jos voidaan osoittaa, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt). Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testiaineen määrää (C_t) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä C_t-määritystä ovat ± 20 prosenttia toisiinsa verrattuna eikä C_t ole kasvanut merkittävästi ensimmäisen ja viimeisen perättäisen määrityksen välisenä aikana. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä perättäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, voidaan joko laskea BCF soveltamalla kineettistä lähestymistapaa, joka ei edellytä tasapainotilan saavuttamista, tai jatkaa kertymäaikaa ja tehdä mittauksia niin kauan, että tasapainotila saavutetaan, tai kun on kulunut 60 vuorokautta riippuen siitä, kumpi tapahtuu aiemmin. Testiaineen pitoisuuden on myös oltava kalassa riittävän korkea kertymävaiheen lopussa, jotta k_2-arvo voidaan arvioida luotettavasti poistumavaiheessa. Jos kertymä ei ole 28 vuorokauden jälkeen merkittävä, testi voidaan lopettaa.

Poistumavaiheen kesto

Ensimmäisen asteen kinetiikkaa noudattavilla aineilla puolet kertymävaiheesta riittää tavallisesti siihen, että kalaan kertynyt aine vähenee riittävästi (esim. 95 prosenttia) (ks. liite 5, arviointia koskeva selitys). Jos 95 prosentin vähenemiseen pääseminen kestää erittäin kauan, esimerkiksi yli kaksi kertaa kertymävaiheen normaalin kestoajan (eli yli 56 vuorokautta), voidaan hyväksyä lyhyempi aika (esim. kunnes testiaineen pitoisuus on alle 10 prosenttia tasapainotilasta). Jos aineen kertymä ja poistuma ovat monimutkaisempia kuin yhden osaston mallissa, jota voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikalla, poistumavaiheen on kuitenkin mahdollisesti oltava pidempi. Jos aineen kinetiikan havaitaan ja/tai ennakoidaan olevan monimutkaisempi, on suositeltavaa pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijalta testiolosuhteiden soveltuvuuden varmistamiseksi. Koska poistumavaihe pitenee, näytteenotossa käytettävien kalojen määrä voi aiheuttaa rajoituksia ja kalojen väliset kasvuerot saattavat vaikuttaa tuloksiin. Vaiheen kestoon vaikuttaa myös se, kuinka kauan testiaineen pitoisuus kalassa pysyy kvantifioinnin analyysirajan yläpuolella.

Testikalojen määrä

Kalojen lukumäärä jokaista testipitoisuutta kohti valitaan siten, että käytettävissä on vähintään neljä kalaa näytteenottopistettä kohti. Kalanäytteet voidaan yhdistää, jos yksittäisten kalojen analysointi ei ole mahdollista. Jos käyrän sovitus (ja siitä johdetut muuttujat) on tarkoitus tehdä erittäin tarkasti tai edellytetään metabolismitutkimusten tekemistä (esimerkiksi metaboliittien ja perusaineen erottelemiseksi radioaktiivisia merkkiaineita käytettäessä), kaloja on oltava enemmän kutakin näytteenottopistettä kohti. Rasvapitoisuus olisi määritettävä samasta biologisesta aineksesta, jota käytetään testiaineen pitoisuuden määrittämisessä. Jos tämä ei ole mahdollista, kaloja tarvitaan mahdollisesti enemmän (ks. 56 ja 57 kohta).

Jos käytetään täysikasvuisia (sukukypsiä) kaloja, kalojen ei pitäisi olla ennen testiä tai sen aikana kutuvaiheessa tai hiljattain kutenut. Lisäksi on ilmoitettava, käytetäänkö testissä koiraita, naaraita vai molempia. Jos käytetään molempia, sukupuolten väliset erot kasvussa rasvapitoisuudessa on kirjattava ei-merkitseviksi ennen altistuksen aloittamista, etenkin jos etukäteen arvioidaan, että koiras- ja naaraskalojen näytteet on yhdistettävä sen varmistamiseksi, että aineen pitoisuudet ja/tai rasvapitoisuus voidaan havaita.

Jokaiseen testiin on valittava samanpainoisia kaloja, jolloin pienimpien on painettava vähintään kaksi kolmasosaa suurimpien painosta. Kaikkien pitäisi olla samaa vuosiluokkaa ja peräisin samasta lähteestä. Koska paino ja ikä saattavat joskus vaikuttaa merkittävästi BCF-arvoihin (12), ne on kirjattava tarkasti. Osa näytekaloista on suositeltavaa punnita juuri ennen testin aloittamista keskipainon arvioimiseksi (ks. 61 kohta).

Täyttö

Vesimäärän pitäisi olla suuri suhteessa kalojen määrään, jotta testattavan yhdisteen pitoisuus vedessä laskee mahdollisimman vähän, kun kalat lisätään kammioon testin alussa, eikä liuenneen hapen pitoisuus ei laske. On tärkeää, ettei kaloja lisätä kammioon liian nopeasti. Joka tapauksessa kalojen täyttönopeudeksi suositellaan normaalisti 0,1-1,0 g kalaa (tuorepaino) litraa vettä kohti vuorokaudessa. Kalat voidaan lisätä veteen nopeammin, jos osoitetaan, että testiaineen pitoisuus voidaan pitää ± 20 prosentin rajoissa eikä liuenneen hapen pitoisuus laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästyneisyysarvosta (ks. 24 kohta).

Sopivaa täyttötapaa valittaessa on otettava huomioon kalalajin luonnollinen elinympäristö. Esimerkiksi pohjakalat voivat vaatia samaa vesitilavuutta kohti suuremman pohjapinta-alan kuin pelagiset kalalajit.

Ruokinta

Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kalojen ravinnossa noudatetaan ruokavaliota, jonka rasvapitoisuus ja valkuaisaineiden kokonaispitoisuus tunnetaan. Ravintoa annetaan riittävästi niin, että kalat pysyvät terveinä ja niiden paino ei pysy samana (pieni kasvu sallitaan). Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kaloille päivittäin annettavan ravinnon määrä riippuu valitusta lajista, koeoloista ja ravinnon kaloripitoisuudesta (esimerkiksi kirjolohella päivittäinen määrä on noin 1–2 prosenttia kalan painosta). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Jotta ruokkimistaajuus pysyisi samana, ravinnon määrä pitäisi laskea tarvittaessa uudelleen esimerkiksi kerran viikossa. Tässä laskutoimituksessa kussakin testikammiossa olevien kalojen paino voidaan arvioida viimeksi kyseisestä kammiosta näytteeksi otetun kalan painosta. Kammiossa olevia kaloja ei punnita.

Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet olisi poistettava testikammioista päivittäin hieman (0,5–1 tuntia) ruokinnan jälkeen. Kammiot olisi pidettävä mahdollisimman puhtaina koko testin ajan, jotta orgaanisen aineksen pitoisuus pysyy mahdollisimman alhaisena (ks. 29 kohta), koska orgaaninen hiili saattaa vaikuttaa haitallisesti testiaineen biologiseen hyötyosuuteen (12).

Koska monet rehut on valmistettu kalajauhoista, on varmistettava, ettei rehu vaikuta testituloksiin tai aiheuta haittavaikutuksia esimerkiksi sen takia, että se sisältää torjunta-aineita, raskasmetalleja ja/tai testiainetta (tai niiden jäämiä).

Valo ja lämpötila

Suositeltava valoisa aika on 12–16 tuntia. Lämpötilan pitäisi olla kalalajille sopiva (vaihtelu enintään ± 2 °C) (ks. lisäys 3). Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava. Testiaineen mahdollinen muuntuminen tutkimuksen säteilyolosuhteissa on otettava huomioon. Valaistusolosuhteiden olisi oltava asianmukaiset, ja kalojen altistumista epäluonnolliselle valolle on vältettävä. Joskus voi olla tarpeen suodattaa pois alle 290 nm:n UV-säteily.

Testipitoisuudet

Testi on alun perin suunniteltu polaarittomille orgaanisille aineille. Kyseisillä aineilla kalojen altistus yhdelle pitoisuudelle arvioidaan riittäväksi, koska pitoisuusvaikutuksia ei ole odotettavissa. Sovellettavassa säädöskehyksessä saatetaan kuitenkin edellyttää kahta pitoisuutta. Jos testataan kyseiseen tyyppiin kuulumattomia aineita tai tiedossa on viitteitä mahdollisesta pitoisuusriippuvuudesta, testi on suoritettava kahdella tai useammalla pitoisuudella. Jos testataan vain yhtä pitoisuutta, yhden pitoisuuden käyttö on perusteltava (ks. 79 kohta). Testatun pitoisuuden pitäisi myös olla niin alhainen kuin käytännön tai tekniikan puolesta on mahdollista (eli sen ei pidä olla lähellä liukoisuuden raja-arvoa).

Joissakin tapauksissa voidaan ennakoida, että aineen biokertyvyys on riippuvainen vesipitoisuudesta (esimerkiksi metalleilla, joiden kertymistä kaloihin voidaan säännellä ainakin osittain). Tällaisissa tapauksissa on tarpeen testata vähintään kaksi, mutta mieluiten useampi sellainen pitoisuus (ks. 49 kohta), jotka ovat ympäristön kannalta merkityksellisiä. Myös aineilla, joilla testatun pitoisuuden on oltava käytännön syistä lähellä liukoisuuden raja-arvoa, suositellaan vähintään kahden pitoisuuden testaamista, koska siten voidaan saada käsitys altistuspitoisuuksien luotettavuudesta. Testipitoisuudet pitäisi valita siten, että testeihin sisällytetään sekä ympäristön kannalta realistinen pitoisuus että tehtävän arvioinnin kannalta merkityksellinen pitoisuus.

Testiaineen pitoisuus pitäisi valita siten, että se on alhaisempi kuin krooninen vaikutustaso tai yhden prosentin aineen akuutista asymptoottisesta LC_{50}-arvosta. Pitoisuuden on myös oltava ympäristön kannalta merkityksellinen ja suuruusluokaltaan vähintään yhden asteen korkeampi kuin aineen kvantifiointiraja vedessä kyseistä analyysimenetelmää käytettäessä. Korkein sallittu testipitoisuus voidaan myös määrittää jakamalla akuutti 96 tunnin LC_{50}-arvo asianmukaisella akuutti/krooninen-suhteella (tarkoituksenmukaiset suhteet joillekin aineille ovat noin 3, mutta muutamassa tapauksessa yli 100). Jos käytetään toista pitoisuutta, sen eron edelliseen pitoisuuteen on oltava kymmenkertainen. Jos tämä ei ole mahdollista toksisuuskriteereiden takia (kyseiset perusteet rajoittavat korkeamman testipitoisuuden käyttöä) tai määritysrajan takia (kyseinen raja estää alhaisemman testipitoisuuden käytön), voidaan käyttää pienempää kerrointa kuin kymmenen. Tällöin pitäisi myös harkita radioaktiivisen testiaineen käyttöä (sen on oltava mahdollisimman puhdasta, mieluiten yli 98 prosenttista). On varmistettava, ettei yksikään käytetty pitoisuus alita testiaineen liukoisuusrajaa väliaineessa.

Kontrollit

Laimennusvesi tarkastetaan kerran ja tarvittaessa (ks. 30 ja 31 kohta) testisarjan lisäksi tehdään yksi liuotinkontrolli.

Veden laatua koskevien mittausten taajuus

Testin aikana on mitattava liuennut happi, TOC (orgaanisen hiilen kokonaismäärä), pH ja lämpötila kaikista testi- ja kontrolliastioista. Veden kokonaiskovuus ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta. Jos testattavia pitoisuuksia on kaksi tai useampi, kyseiset muuttujat mitataan suuremmasta (tai suurimmasta) pitoisuudesta. Liuennut happi ja suolapitoisuus on mitattava (mikäli aiheellista) vähintään kolme kertaa kertymävaiheessa – sen alussa, keski- ja loppuvaiheessa – sekä kerran viikossa poistumavaiheen aikana. TOC on mitattava testin alussa (24 ja 48 tuntia ennen kertymävaiheen alkua), ennen kalojen lisäämistä astiaan ja vähintään kerran viikossa sekä kertymä- että poistumisvaiheen aikana. Lämpötila on mitattava ja kirjattava ylös joka päivä, pH kunkin vaiheen alussa ja lopussa sekä kovuus kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä astiassa.

Näytteenotto ja mittaukset kaloista ja vedestä

Näytteenottoaikataulu

Testiaineen pitoisuuden määrittämiseen käytetyistä testikammioista olisi otettava vesinäyte ennen kalojen lisäystä sekä kertymä- ja poistumisvaiheen aikana. Vesinäyte pitäisi ottaa ennen ruokintaa kalanäytteiden oton yhteydessä. Tiheämpi näytteenotto voi olla hyödyllistä sen varmistamiseksi, että pitoisuudet pysyvät stabiileina kalojen lisäämisen jälkeen. Kertymävaiheen aikana pitäisi määrittää testiaineen pitoisuudet sen tarkistamiseksi, että hyväksyttävyysperusteet täyttyvät (24 kohta). Jos poistumavaiheen alussa tehtävät vesinäyteanalyysit osoittavat, ettei testiainetta havaita, tätä voidaan käyttää perusteena sille, ettei testiaineen jäämiä mitata testi- ja kontrollivedestä poistumavaiheen loppuaikana.

Kaloista pitäisi ottaa näyte ainakin viidesti kertymävaiheen aikana ja vähintään neljästi poistumavaiheen aikana testiaineen mittaamiseksi. Koska joskus voi olla vaikea laskea riittävän tarkkaa arviota BCF-arvosta tämän näytemäärän perusteella (erityisesti jos näyttää siltä, että kertymä ja poistuma noudattavat muuta kuin yksinkertaista ensimmäisen asteen kinetiikkaa), tiheämpi näytteenotto voi olla suositeltavaa molemmissa vaiheissa (ks. lisäys 4).

Rasvapitoisuus pitäisi määrittää siitä biologisesta aineksesta, jota käytetään testiaineen pitoisuuden määrittämiseen, ainakin kertymävaiheen alussa ja lopussa sekä poistumavaiheen lopussa. Jos tämä ei ole mahdollista, pitäisi ottaa näyte vähintään kolmesta kalayksilöstä rasvapitoisuuden määrittämiseksi jokaisena kolmena ajankohtana. Kalojen määrä kussakin säiliössä kokeen alkaessa pitäisi määrittää tämän mukaisesti ([1]). Jos vertailukaloissa (eli kantapopulaation kaloissa) ei havaita merkittävää määrää testiainetta, vertailukaloista voidaan vaihtoehtoisesti määrittää ainoastaan rasvapitoisuus ja testiaineen pitoisuus (sekä siihen liittyvä kertymävakio ja BCF-arvot) voidaan korjata vertailuryhmän testin aikaisen rasvapitoisuuden mukaisesti ([2]).

Kuolleista tai sairastuneista kaloista ei pitäisi määrittää testiaineen pitoisuutta eikä rasvapitoisuutta.

Hyväksyttävästä näytteenottoaikataulusta on esimerkki lisäyksessä 4. Muunlaiset aikataulut voidaan laskea helposti käyttäen muita oletettuja K_{OW}-arvoja 95 prosentin kertymään tarvittavan altistusajan laskemiseksi (ks. laskentaperusteet lisäyksessä 5).

Näytteenottoa pitäisi jatkaa kertymävaiheessa tasapainotilan saavuttamiseen asti (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt) tai kun kertymävaihe päättyy (28 tai 60 vuorokauden kuluttua, ks. 37 ja 38 kohta). Ennen poistumavaiheen aloittamista kalat pitäisi siirtää puhtaisiin astioihin.

Näytteenotto ja näytteiden valmistelu

Vesinäytteet otetaan määritystä varten esimerkiksi lapolla inertin putken/letkun kautta testikammion keskivaiheilla olevasta kohdasta. Suodattamalla tai sentrifugoimalla ei aina pystytä erottamaan testiaineen biologisesti hyödyntämiskelvotonta osaa biologisesti hyödynnettävästä osasta. Jos käytetään erotustekniikkaa, valittu tekniikka on aina perusteltava tai validoitava testiraportissa biologiseen hyötyosuuteen liittyvien hankaluuksien takia (25). Erittäin hydrofobisilla aineilla (eli aineilla, joiden log K_{OW} on > 5) (12) (26), jotka saattavat adsorboitua suodatusmatriisiin tai sentrifugointisäiliöihin, näytteitä ei pitäisi käsitellä edellä mainituilla tavoilla. Sen sijaan on huolehdittava siitä, että säiliöt pidetään mahdollisimman puhtaina (ks. 46 kohta), ja orgaanisen hiilen kokonaismäärää on seurattava sekä kertymä- että poistumavaiheessa (ks. 53 kohta). Biologisen hyötyosuuden pienenemiseen liittyvien mahdollisten ongelmien välttämiseksi heikosti liukenevien ja erittäin hydrofobisten aineiden näytteenotossa voidaan käyttää kiinteäfaasimikrouuttoa.

([1]) Jos rasvapitoisuutta ja testiainetta ei määritetä samoista kaloista, analysoitavien kalojen pitäisi ainakin olla saman painoisia ja samaa sukupuolta (jos sukupuolella on merkitystä).

([2]) Tätä vaihtoehtoa voidaan soveltaa vain siinä tapauksessa, että kalojen määrä on kaikissa testiryhmässä sama, kaloja poistetaan samoin perustein ja niitä ruokitaan samalla tavalla. Näin voidaan varmistaa, että kalojen kasvu on samanlaista kaikissa testiryhmissä, jos testattu pitoisuus jää toksisuusalueen alle. Jos kasvu on samanlaista, myös rasvapitoisuuden odotetaan olevan sama. Erilainen kasvu vertailuryhmässä on viite aineen vaikutuksesta eikä tutkimus olisi validi.

Näytteenotossa käytetyt kalat pitäisi lopettaa välittömästi sopivinta ja inhimillisintä menetelmää käyttäen (kokonaisilla kaloilla tehtävissä kokeissa kalat pitäisi näytteenoton jälkeen vain huuhdella vedellä (ks. 28 kohta) ja kuivata taputtamalla). Kalat punnitaan ja niiltä mitataan kokonaispituus ([1]). Jokaisella näytteeksi otetulla kalalla mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn ainepitoisuuteen (ja tarvittaessa myös rasvapitoisuuteen) esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta.

On suositeltavaa tehdä määritykset kaloista ja vedestä heti näytteenoton jälkeen, jotta ei tapahtuisi hajoamista tai muuta ainehävikkiä ja jotta voidaan laskea likimääräiset kertymä- ja poistumavakiot testin edetessä. Kun näytteet määritetään heti, voidaan myös nähdä nopeasti, milloin tasapainotila on saavutettu.

Jos näytteitä ei voi määrittää heti, ne pitäisi säilyttää asianmukaisella tavalla. Ennen testin aloittamista on hankittava tietoja testiaineen oikeasta säilytystavasta, joka voi olla esimerkiksi pakastaminen, säilyttäminen 4 °C:ssa, uuttaminen jne. Säilytysaika pitää valita siten, ettei aineen laatu heikkene varastoinnin aikana.

Analyysimenetelmän laatu

Koska koko menetelmä riippuu olennaisesti testiaineen määritykseen käytettävän menetelmän tarkkuudesta, täsmällisyydestä ja herkkyydestä, on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä aineen määrityksen tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testiaineen saanto sekä vedestä että kaloista ovat tyydyttäviä. Tämä pitäisi tehdä alustavien testien yhteydessä. On myös tarkastettava, ettei testiainetta ole laimennukseen käytetyssä vedessä mitattavia määriä. Testissä määritetyt testiaineen pitoisuusarvot vedessä ja kaloissa on tarvittaessa korjattava saantoja ja kontrollien tausta-arvoja varten. Kala- ja vesinäytteitä pitäisi käsitellä koko ajan siten, että kontaminoituminen ja hävikki (joka voi johtua esimerkiksi adsorboitumisesta näytteenottolaitteistoon) ovat mahdollisimman pienet.

Kalanäytteiden analysointi

Jos testissä käytetään radioaktiivisia merkkiaineita, on mahdollista määrittää kokonaisradioaktiivisuus (ts. perusaine ja siitä syntyneet metaboliitit) tai näytteet voidaan puhdistaa siten, että perusaine on mahdollista määrittää erikseen. Jos BCF-arvo määritetään perusaineen perusteella, merkittävien metaboliittien ominaisuudet pitäisi määritellä ainakin kertymävaiheen lopussa (ks. 6 kohta). Merkittäviä metaboliitteja ovat ne, joiden osuus on ≥ 10 prosenttia kalan kudoksissa havaittavista kokonaisjäämistä, joiden osuus on ≥ 5 prosenttia kahdessa perättäisessä näytteenottopisteessä, joiden osuus kasvaa koko kertymävaiheen ajan tai jotka tiedetään myrkyllisiksi. Jos koko kalan BCF-arvo radioaktiivisten jäämien kokonaismääränä ilmaistuna on ≥ 500, voi olla suositeltavaa – ja tiettyihin luokkiin kuuluvien aineiden, kuten torjunta-aineiden tapauksessa erittäin suositeltavaa – tunnistaa ja kvantifioida merkitykselliset metaboliitit. Jotkut sääntelyviranomaiset myös edellyttävät kyseisten metaboliittien kvantifioimista. Jos kalan kudoksista tunnistettujen ja kvantifioitujen hajoamistuotteiden osuus on ≥ 10 prosenttia radioaktiivisten jäämien kokonaismäärästä, on suositeltavaa tunnistaa ja kvantifioida hajoamistuotteet myös testivedestä. Jos tämä ei ole mahdollista, syyt on selvitettävä testiraportissa.

Testiaineen pitoisuus on tavallisesti määritettävä kustakin yksittäisestä punnitusta kalasta. Jos tämä ei ole mahdollista, näytteet voidaan yhdistää kullakin näytteenottokerralla, mutta näytteiden yhdistäminen rajoittaa kyseisiin tietoihin sovellettavia tilastomenettelyjä. Näin ollen testissä pitäisi varmistaa, että kalojen määrä vastaa haluttua yhdistämistä, tilastomenettelyä ja voimaa. Viitteitä (27) ja (28) voi käyttää johdantona olennaisiin yhdistämismenettelyihin.

([1]) Painon lisäksi pitäisi kirjata kokonaispituus, koska testin aikaisen pituuskasvun nopeutta vertaamalla saadaan hyödyllistä tietoa siitä, onko aineella ollut haittavaikutuksia.

BCF pitäisi ilmoittaa normalisoituna viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (kalan tuorepainoon verrattuna) suoraan tutkimuksesta johdettavan arvon lisäksi (ks. 21 kohta), paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvoihin. Jos mahdollista, kalan rasvapitoisuus olisi määritettävä jokaisella näytteenottokerralla ja mieluiten samasta uutteesta, josta testiaine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografisessa analyysissa. Testiaineiden analysointi edellyttää kuitenkin usein erityisiä uuttomenetelmiä, jotka saattavat olla ristiriidassa rasvapitoisuuden määrittämiseen käytettävien testimenetelmien kanssa. Tässä tapauksessa (niin kauan kuin käytettävissä ei ole sopivia non-destruktiivisia menetelmiä) kalojen rasvapitoisuuden määrittämisessä on suositeltavaa soveltaa erilaista strategiaa (ks. 56 kohta). Sopivia menetelmiä pitäisi käyttää rasvapitoisuuden määrittämiseksi (20). Kloroformi-metanoliuuttoa (29) voidaan suositella standardimenetelmänä (30), mutta vaihtoehtoisena menetelmänä suositellaan Smedesin menetelmää (31). Jälkimmäinen on uuttomenetelmänä yhtä tehokas, ja se on myös erittäin tarkka, siinä käytetään vähemmän myrkyllisiä orgaanisia liuottimia ja se on myös helppo toteuttaa. Muitakin tarkkuudeltaan suositeltuihin menetelmiin verrattavia menetelmiä voi käyttää, jos käyttö perustellaan asianmukaisesti. Käytetystä menetelmästä on tärkeää toimittaa yksityiskohtaiset tiedot.

Kalojen kasvun mittaaminen

Testin alussa on punnittava erikseen 5–10 kantapopulaation kalaa ja mitattava niiden kokonaispituus. Samoja kaloja voidaan käyttää rasvapitoisuuden määrittämiseen (ks. 56 kohta). Kunkin näytteenottokerran yhteydessä näytteiksi otetuilta testi- ja vertailuryhmien kaloilta on mitattava paino ja pituus ennen kemikaali- ja rasvapitoisuuden määrittämistä. Näytteiksi otettujen kalojen mittoja voidaan käyttää testi- ja kontrollisäiliöihin jäävien kalojen painon ja pituuden arvioinnissa (ks. 45 kohta).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Testiaineen kertymäkäyrä saadaan esittämällä kalassa tai kalan pinnalla (tai määritellyissä kudoksissa) kertymävaiheen aikana olevan aineen pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasapainotilaa (eli käyrä on suunnilleen asymptoottinen aika-akselin kanssa), tasapainotilan BCF (BCF_{SS}) lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:

$$\frac{C_f\, tasapainotilassa(keskiarvo)}{C_w\, tasapainotilassa(keskiarvo)}$$

Kalan kasvu voi vaikuttaa C_f-arvon kehitykseen (ks. 72 ja 73 kohta). Ajan kuluessa tapahtuva vaihtelu vaikuttaa altistuspitoisuuden keskiarvoon (C_w). On odotettavissa, että aikapainotettu keskipitoisuus on bioakkumulaatiotutkimuksissa merkityksellisempi ja täsmällisempi siinäkin tapauksessa, että vaihtelu pysyy asianmukaisella hyväksyttävyysalueella (ks. 24 kohta). Aikapainotettu keskimääräinen pitoisuus vedessä (TWA) voidaan laskea siten kuin esitetään lisäyksen 5 kohdassa 1.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) pitäisi määrittää kahden ensimmäisen asteen kineettisen vakion suhteena (k_1/k_2). Vakiot k_1 ja k_2 sekä BCF_K voidaan määrittää sovittamalla kertymä- ja poistumavaihe samanaikaisesti. Vakiot k_1 ja k_2 voidaan vaihtoehtoisesti määrittää erikseen (ks. kyseisten menetelmien kuvaukset ja vertailu lisäyksessä 5). Poistumavakio (k_2) voidaan joutua korjaamaan kasvun aiheuttaman liukenemisen huomioon ottamiseksi (ks. 72 ja 73 kohta). Jos kertymä- ja/tai poistumakäyrä ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. lisäyksessä 5 olevat viitteet ja pyydä neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta).

Tiedot kalojen painosta ja pituudesta

Yksittäisten kalojen tuorepainot ja kokonaispituudet kaikilla näytteenottoväleillä taulukoidaan erikseen sekä testi- että vertailuryhmässä kertymävaiheessa (koskee myös kantapopulaatiota kertymävaiheen alkaessa) sekä poistumavaiheessa. Kultakin näytteeksi otetulta kalalta mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn kemikaalipitoisuuteen esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta. Paino on paras kasvumittari kineettisten BCF-arvojen korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan (ks. 73 kohta ja lisäyksessä 5 esitetty menetelmä tietojen korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan).

Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävät korjaukset ja rasvapitoisuuden normalisointi

Poistumavaiheessa tapahtuva kasvu voi alentaa kaloissa mitattua kemikaalipitoisuutta, minkä johdosta yleinen poistumavakio (k_2) on suurempi kuin pelkistä poistoprosesseista (esim. hengitys, metabolismi ja ulostaminen) johtuva poistumavakio. Kineettiset biokertyvyystekijät pitäisi korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Kasvu vaikuttaa myös BCF_{SS}-arvoon, mutta sen korjaamiseksi kasvun mukaan ei ole määritetty yleisesti hyväksyttyä menettelyä. Jos kasvu on merkittävää, pitäisi johtaa myös BCF_K, joka korjataan kasvun mukaan (BCF_{Kg}), koska se voi olla biokertyvyystekijän mittana merkittävämpi. Testikalojen rasvapitoisuus (joka liitetään vahvasti hydrofobisten aineiden bioakkumulaatioon) voi käytännössä vaihdella sen verran, että se on normalisoitava kalan vakiorasvapitoisuuden (5 prosenttia tuorepainosta) mukaisesti, jotta sekä kineettinen että tasapainotilan biokertyvyystekijä voidaan esittää tarkoituksenmukaisesti, paitsi jos voidaan olettaa, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan (esimerkiksi jotkut perfluoratut aineet saattavat sitoutua proteiineihin). Näitä laskutoimituksia koskevia yhtälöitä ja esimerkkejä esitellään lisäyksessä 5.

Kineettisen BCF:n korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan myös poistumavakiota pitäisi korjata kasvun mukaisesti. Kasvukorjattu poistumavakio (k_{2g}) lasketaan vähentämällä kasvuvakio (k_g, joka on saatu punnitustiedoista) yleisestä poistumavakiosta (k_2). Tämän jälkeen lasketaan kasvukorjattu kineettinen biokertyvyystekijä jakamalla kertymävakio (k_1) kasvukorjatulla poistumavakiolla (k_{2g}) (ks. liite 5). Joissakin tapauksissa tämä lähestymistapa aiheuttaa hankaluuksia. Esimerkiksi silloin, kun testataan hyvin hitaasti poistuvia aineita nopeasti kasvavissa kaloissa, johdettu k_{2g} voi olla hyvin pieni, joten kyseisissä kahdessa johtamisessa käytetyssä vakiossa piilevä virhe muuttuu kriittiseksi. Joissakin tapauksissa arvioitu kg voi olla suurempi kuin k_2. On olemassa vaihtoehtoinen lähestymistapa, joka ei edellytä korjaamista kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Siinä käytetään testiaineen massaa koskevia poistumatietoja kalakohtaisesti (kokonainen kala perusteena) sen sijaan, että testiaineen massaa koskevat tiedot suhteutettaisiin kalan massayksikköä (pitoisuutta) koskeviin tietoihin. Tämä voidaan tehdä helposti, koska kyseisessä testimenetelmässä kudoksissa havaitut pitoisuudet pitäisi liittää yksittäisten kalojen painoon. Tätä koskevaa yksinkertaista menettelyä kuvataan lisäyksessä 5. On huomattava, että k_2 pitää ilmoittaa myös vaihtoehtoista lähestymistapaa sovellettaessa.

Lisäksi pitäisi ilmoittaa kineettinen ja tasapainotilan biokertyvyystekijä kalojen viiden prosentin vakiorasvapitoisuuden (suhteessa tuorepainoon) mukaisesti, paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan. Kaloissa mitattuja pitoisuuksia koskevat tiedot tai BCF normalisoidaan viiden prosentin rasvapitoisuuden ja todellisen (yksittäisen kalan) keskimääräisen rasvapitoisuuden (prosenttiosuus tuorepainosta) suhteen mukaisesti (ks. liite 5).

Jos samasta kalasta on määritetty kemikaali- ja rasvapitoisuus, yksittäisen kalan normalisoitua rasvapitoisuutta pitäisi käyttää rasvapitoisuuden mukaan normalisoidun BCF:n laskemisessa. Jos vertailu- ja altistusryhmien kalojen kasvu on samanlaista, rasvapitoisuuden korjaamisessa voidaan vaihtoehtoisesti käyttää ainoastaan vertailukalojen rasvapitoisuutta (ks. 56 kohta). Rasvapitoisuuden mukaan normalisoidun BCF:n laskentamenetelmä kuvataan lisäyksessä 5.

Tulosten tulkinta

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut tulokset ovat lähellä analyysimenetelmän havaitsemisrajaa.

Testi- ja vertailuryhmien kalojen keskimääräinen kasvu ei saisi periaatteessa erota merkittävästi, jotta voidaan sulkea pois toksisuus. Kummankin ryhmän kasvuvakioita tai kasvukäyriä pitäisi verrata tarkoitukseen sopivalla menetelmällä ([1])).

([1]) Kasvuvakioita koskeva *t*-testi voidaan tehdä sen määrittämiseksi, onko vertailu- ja testiryhmien kalojen kasvussa eroja. Vaihtelu voidaan analysoida *F*-testillä. *F*-testiä tai uskottavuusosamäärätestiä voidaan tarvittaessa käyttää apuna sopivan kasvumallin valinnassa (OECD monograph 54, (32).

Jos kertymä- ja poistumakäyrät ovat selkeitä, biokertyvyystietoja voidaan pitää hyvälaatuisina. Eri vakioiden osalta χ^2-sopivuustestin tulosten pitäisi osoittaa, että bioakkumulaatiomallin sopivuus on hyvä (eli mittavirheiden osuus on pieni (32)), jotta vakioita voitaisiin pitää luotettavina (ks. liite 5). Jos testissä käytetään useampaa kuin yhtä pitoisuutta, testipitoisuuksien välinen kertymä- ja poistumisvakioiden vaihtelu saa olla enintään 20 prosenttia ([1]). Jos näin ei ole, voidaan osoittaa pitoisuusriippuvuus. Jos kertymä-/poistumavakioissa havaitaan merkittäviä eroja käytettyjen testipitoisuuksien välillä, ne on kirjattava ja mahdollisuuksien mukaan myös selitettävä. BCF-arvojen 95 prosentin luotettavuustaso hyvin suunnitelluissa kokeissa on yleensä lähellä ± 20:tä prosenttia johdetusta BCF:stä.

Jos testissä käytetään kahta tai useampaa pitoisuutta, molempien tai kaikkien pitoisuuksien tuloksia käytetään sen määrittämiseksi, ovatko tulokset johdonmukaisia ja riippuvatko ne pitoisuudesta. Jos testataan vain yksi pitoisuus eläinten ja/tai resurssien käytön vähentämiseksi, se on perusteltava.

Saatu BCF_{SS} on epäilyttävä, jos BCF_K on huomattavasti sitä suurempi, koska tämä voi olla viite siitä, ettei tasapainotilaa ole saavutettu tai kasvun aiheuttamaa liukenemista ja poistumaprosesseja otettu huomioon. Jos BCF_{SS} on hyvin paljon suurempi kuin BCF_K, johdetut kertymä- ja poistumavakiot olisi tarkistettava mahdollisten virheiden varalta ja arvioitava uudelleen. Erilainen sovitusmenetelmä saattaisi helpottaa BCF_K:n arvioimista (ks. liite 5).

Testiraportti

Kohdassa 3 tarkoitettujen testiaineen tietojen lisäksi testiraportti sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

Fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— Kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

— Useammasta ainesosasta koostuvien aineiden ja koostumukseltaan tuntemattomien tai vaihtelevien aineiden, kompleksien reaktiotuotteiden tai biologisen materiaalin (UCVB) osalta mahdollisimman kattava kuvaus kunkin yksittäisen ainesosan kemiallisista tiedoista ja osuudesta aineen kokonaismassasta. Tiivistelmä siitä, miten testissä sovellettu analyysimenetelmä vastaa aineen pitoisuuden mittaamista; kaikkia analyysiprosesseja sekä menetelmän sopivuutta, menetelmän havaitsemisrajaa ja kvantifiointirajaa koskevat tiedot pitäisi antaa.

— Jos kyseessä on radioaktiivinen merkkiaine, on ilmoitettava merkatun atomin (merkattujen atomien) tarkka sijainti ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden määrä.

— Tiedot testiaineen myrkyllisyydestä kaloille (ideaalitilanteessa testatuille lajeille). Myrkyllisyys pitäisi ilmoittaa akuuttina 96 tunnin LC_{50}-arvona ja kroonisessa tutkimuksessa saatuina NOAEC-arvona (pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) ja LOAEC-arvona (alhaisin havaittavan haittavaikutuksen pitoisuus) (sen mukaan, onko kyseessä varhaiskehitysvaiheen testi vai koko elinkaaren kattava testi, jos tieto on saatavilla).

— Testikemikaalin tai testiaineen varastointiolosuhteet ja stabiliteetti varastoinnin aikana, jos kemikaali tai aine on varastoitu ennen käyttöä.

Testilajit:

Tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, sukupuoli (jos merkitystä) koko (paino ja pituus) jne.

([1]) Kyseiset prosenttiluvut osoittavat, että analyysimenetelmät ovat luotettavia ja puoliintumisaika on < 14 vuorokautta. Jos analyysimenetelmät eivät ole näin luotettavia tai puoliintumisaika on (huomattavasti) pidempi, luvut ovat suurempia.

Testiolosuhteet:

— Käytetty testimenettely (kuten läpivirtaus tai puolistaattinen järjestelmä), tavallinen tai minimijärjestely (sekä tähän liittyvät syyt ja perustelut).

— Käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t).

— Testijärjestelyjen kuvaus (esim. testikammioiden lukumäärä ja koko, veden vaihtumisnopeus, täyttönopeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, kalojen lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä, testipitoisuuksien lukumäärä, kertymä- ja poistumavaiheiden kesto, kala- ja vesinäytteiden näytteenottotaajuus).

— Kantaliuosten valmistus ja niiden uusimistaajuus (liuotusaine ja sen pitoisuus ja osuus testivedessä olevan orgaanisen hiilen kokonaismäärästä on ilmoitettava, jos käytetään liuotusainetta) tai kuvaus vaihtoehtoisesta annostelujärjestelmästä.

— Nimelliset testipitoisuudet, testiastioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat sekä menetelmä, jolla ne on laskettu, ja mittausten taajuus.

— Laimennusveden alkuperä, mahdolliset esikäsittelyt, osoitukset kalojen kyvystä elää tässä vedessä sekä vettä koskevat tiedot: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännöskloorin tasot (jos ne on mitattu), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, suspensiossa olevat kiinteät aineet, väliaineen suolapitoisuus (jos aiheellista) ja muut mahdolliset mittaukset.

— Testiastioissa olevan veden laatu, pH, kovuus, TOC, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus; käytetyt menetelmät ja mittaustaajuus.

— Yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehutyyppi tai -tyypit, rehun alkuperä ja koostumus (vähintään rasva- ja valkuaisainepitoisuus mahdollisuuksien mukaan), valittu ruokkimistiheys, annetut määrät ja syöttötaajuus).

— Kala- ja vesinäytteiden käsittelyä koskevat tiedot, mukaan lukien testiaineen valmistusta, säilyttämistä, uuttamista ja määritysmenetelmiä (ja niiden täsmällisyyttä) sekä rasvapitoisuutta koskevat tiedot.

— Käsittelyssä käytetyt satunnaistamismenetelmät ja kalojen lajittelu testiastioihin.

— Päivämäärät, jolloin testiorganismit on lisätty testiliuoksiin, sekä testin kesto.

— Kuvaus alueenmäärityskokeista ja niiden tuloksista, jos saatavilla.

Tulokset:

— Mahdollisista esitutkimuksista saadut tulokset.

— Vertailukalojen ja kussakin altistuskammiossa olevien kalojen kuolleisuus sekä mahdollinen tavallisuudesta poikkeava käyttäytyminen.

— Tiedot mahdollisista havaituista haittavaikutuksista.

— Kattava kuvaus kaikista kemikaalien analysoinnissa käytetyistä menettelyistä havaitsemis- ja kvantifiointirajat, vaihtelu ja saanto mukaan luettuina.

— Kalojen rasvapitoisuus ja sen määrittämismenetelmä, ja jos se on johdettu, rasvapitoisuuden normalisointikerroin (L_n, jota käytetään osoittamaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuteen perustuvat tulokset).

— Taulukoidut tiedot kalojen painoista (ja pituuksista) yhdistettyinä yksittäisten kalojen kemikaalipitoisuuksiin (ja tarvittaessa rasvapitoisuuksiin) sekä vertailu- että altistusryhmässä (esimerkiksi käyttämällä kustakin näytteeksi otetusta kalasta yksilökohtaista tunnistetta) ja johdettuun kasvuvakioon (johdettuihin kasvuvakioihin) liittyvät laskutoimitukset.

— Taulukoidut tiedot testiaineen pitoisuudesta kaloissa (C_f, liitettyinä yksittäisiin kaloihin) ja vedessä (C_w) (mukaan lukien testi- ja vertailuryhmän keskiarvot, standardipoikkeama ja standardivaihteluväli, jos tarpeen) kaikkina näytteenottoajankohtina (C_f ilmaistuna milligrammoina kiloa kohti kalan kokonaistuorepainosta tai tietyistä kudoksista, esimerkiksi rasvapitoisuus, ja C_w ilmaistuna milligrammoina litraa kohti). C_w-arvot verrokkisarjalle (tausta-arvo on myös ilmoitettava).

— Käyrät (kaikki mittaustiedot mukaan luettuina), joista käyvät ilmi seuraavat tiedot (tarvittaessa pitoisuudet voidaan ilmaista suhteessa kokonaispainoon ja rasvapitoisuus voidaan ilmaista normalisoituna kalan tai sen tiettyjen kudosten viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaan):

  — kasvu, esimerkiksi kalan paino verrattuna aikaan tai luennollisen logaritmin mukaan muutettu paino verrattuna aikaan (johdettu kasvuvakio k_g mukaan luettuna)

  — testiaineen kertymä ja poistuma kaloissa (yhdellä kuvaajalla osoitettuina)

  — tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (jos saavutettu)

  — luonnollisen logaritmin mukaan muutettu pitoisuus verrattuna kertymäaikaan (johdettu kertymävakio k_1 mukaan luettuna)

  — luonnollisen logaritmin mukaan muutettu pitoisuus (lineaarinen konsentraatio) verrattuna poistuma-aikaan (johdettu poistumavakio k_2 mukaan luettuna)

  — kertymä- ja poistumavaiheiden käyrät, jotka osoittavat sekä tiedot että sovitetun mallin.

— Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

— Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}), jos tasapainotila on (melkein) saavutettu.

— Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ja johdetut kertymä- ja poistumavakiot k_1 ja k_2 sekä k_2-arvon varianssit (kulmakerroin ja leikkauspiste), jos sovelletaan vaiheittaista sovitusta.

— Luottamusvälit, standardi poikkeama (jos saatavilla) sekä kutakin käytettyä testiaineen pitoisuutta koskevien muuttujien laskennassa/analysoinnissa sovelletut menetelmät.

  — Mahdolliset tiedot radioaktiivisten merkkiaineiden metaboliiteista ja niiden kertymisestä.

  — Kasvuvakio(t) (sekä 95 prosentin luottamusväli(t)) ja laskennallinen kasvukorjattu poistumavakio (k_{2g}), puoliintumisaika ja BCF-arvot (BCF_{Kg}).

  — Mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

  — Yhteenvetotaulukko merkityksellisistä määritetyistä ja laskennallisista tiedoista seuraavasti:

Aineen kertymä- ja poistumavakiot ja biokertyvyystekijät (BCF)	
k_g (kasvuvakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_1 (yleinen kertymävakio; $l\ kg^{-1}\ vrk^{-1}$):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_2 (yleinen poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_{2g} (kasvukorjattu poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
C_f (kemikaalin pitoisuus kalassa tasapainopainotilassa; mg/kg^{-1}):	Lisää arvo ± SD (2)
C_w (kemikaalin pitoisuus vedessä; mg/l^{-1}):	Lisää arvo ± SD (2)
L_n (rasvapitoisuuden normalisointikerroin):	Lisää arvo (3)

Aineen kertymä- ja poistumavakiot ja biokertyvyystekijät (BCF)	
BCF_{SS} (BCF tasapainotilassa; l kg^{-1})	Lisää arvo ± SD (2)
BCF_{SS} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu BCF tasapainotilassa; l kg^{-1})	Lisää arvo (3) ± SD (2)
BCF_K (kineettinen BCF; l kg^{-1})	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
BCF_K (kasvukorjattu kineettinen BCF; l kg^{-1})	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
$t_{1/2g}$ (kasvukorjattu puoliintumisaika; päivä):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
BCF_{KL} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen BCF; l kg^{-1}):	Lisää arvo
BCF_{KLG} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kasvukorjattu kineettinen BCF; l kg^{-1}):	Lisää arvo

(1) CI, Confidence interval: luottamusväli (kun mahdollista arvioida).
(2) SD, Standard deviation: standardi poikkeama (kun mahdollista arvioida).

Ilmoituksia ”ei havaittu/kvantifioitu havaitsemis-/kvantifiointirajalla” pitäisi välttää. Näin ollen menetelmää ja koejärjestelyä on kehitettävä ennen testiä, koska mainitunkaltaisia tuloksia ei voida käyttää nopeusvakioiden laskemisessa.

C.13 – II: **Minimoitu vesialtistustesti kaloilla**

JOHDANTO

Sekä laboratoriot että sääntelyviranomaiset ovat saaneet koko ajan enemmän kokemusta kattavan testin tekemisestä ja tulkinnasta. Se on osoittanut, että – joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta – kertymä- ja poistumavakioiden arvioimisessa voidaan soveltaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Kertymä- ja poistumavakiot voidaan siis arvioida pitämällä näytteenottopisteiden määrä pienempänä ja kineettinen BCF on myös mahdollista johtaa.

Vaihtoehtoisia tapoja järjestää BFC-tutkimukset alettiin tutkia alun perin sen takia, että voitaisiin kehittää kevyempi välivaiheen testi K_{OW}-arvoon ja QSAReihin perustuvien arvioiden hylkäämiseksi tai vahvistamiseksi. Tällöin ei tarvitsisi tehdä kattavaa testiä useilla aineilla, mikä alentaisi kustannuksia ja testieläinten käyttöä, koska näytteenottotarve ja testisekvenssien määrä olisivat pienemmät. Aiempaa testimenetelmää noudatettiin pääpiirteittäin, jotta testitulokset voitaisiin yhdistää aiempien BCF-tietojen kanssa ja testin suorittaminen ja tietojen tulkinta olisi helpompaa. Tavoitteena oli kuitenkin mahdollistaa BCF:n arviointi riittävän tarkasti ja täsmällisesti riskinarviointia koskevien päätösten tekemiseksi. Monia kattavan testin näkökohtia voidaan soveltaa myös minimoidussa testissä. Sellaisia ovat esimerkiksi hyväksyttävyysperusteet (ks. 24 kohta) sekä testin keskeyttäminen, jos kertymävaiheen lopussa havaittava kertymä on mitättömän pieni (ks. 16 ja 38 kohta).

Minimoituun testiin kelpaavia aineita ovat siihen yleiseen ryhmään kuuluvat aineet, jota varten tämä testimenetelmä on kehitetty, eli polaarittomat orgaaniset aineet (ks. 49 kohta). Jos on viitteitä siitä, että testattavaksi aiottu aine saattaisi käyttäytyä eri tavalla (eli poikkeaisi selvästi ensimmäisen asteen kinetiikasta), sääntelyä varten pitäisi tehdä kattava testi.

Minimoidun testin kesto ei tavallisesti ole standardin BCF-testin kestoa lyhyempi, mutta kaloista otetaan vähemmän näytteitä (ks. perustelut lisäyksestä 6). Nopeasti poistuvien aineiden osalta poistumavaihetta voidaan kuitenkin lyhentää, millä vältetään se, että niiden pitoisuudet kaloissa laskevat havaitsemis- tai kvantifiointirajan alapuolelle ennen testin päättymistä. Minimoitu altistustesti, jossa kaloissa testataan vain yhtä pitoisuutta, voidaan käyttää kattavaa testiä koskevan tarpeen arvioimisessa. Jos sen tuloksena saatavat tiedot, joiden perusteella lasketaan nopeusvakiot ja BCF, ovat riittävän luotettavia (ks. 93 kohta), kattavaa testiä ei tarvitse tehdä, koska saatu BCF on kaukana lainsäädännössä asetetuista huolta aiheuttavista arvoista.

Joissakin tapauksissa voi olla hyödyllistä tehdä minimoitu testi esikokeena useammalla kuin yhdellä pitoisuudella sen määrittämiseksi, riippuvatko jotakin ainetta koskevat BCF-arviot pitoisuudesta. Jos minimoidun testin perusteella arvioidut BCF-arvot osoittavat niiden riippuvan pitoisuudesta, on tehtävä kattava testi. Jos minimoidun testin perusteella arvioinut BCF-arvot eivät riipu pitoisuudesta mutta tuloksia ei pidetä lopullisina, sitä mahdollisesti seuraava kattava testi voidaan tehdä vain yhdellä pitoisuudella, jolloin testieläimiä tarvitaan vähemmän kuin kahdessa (tai useammassa) kattavassa testissä.

Minimoituun testiin mahdollisesti kelpaavien aineiden pitäisi täyttää seuraavat edellytykset:

— Ne noudattavat todennäköisesti likimääräisesti ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa, mikä on päätelty johtamalla arvot samankaltaisten aineiden perusteella.

— Niiden log K_{OW} < 6, paitsi jos oletuksena on nopea metaboloituminen ([1]).

— Niiden on oltava riittävän vesiliukoisia valitun analyysitekniikan huomioon ottaen (ks. 24 kohta).

— Niiden on oltava selvästi kvantifioitavia (eli pitoisuuksien pitäisi olla vähintään yhtä suuruusluokkaa suurempia kuin kvantifiointiraja) sekä kaloissa että vedessä, ja radioaktiivisten merkkiaineiden käyttö on suositeltavaa (ks. 23 kohta).

— Niiden poistumavaihe on pidempi kuin ennustettu puoliintumisaika (ks. laskentamenetelmät lisäyksessä 5), tai poistumavaiheen kesto on mukautettava sen mukaisesti (ks. 91 kohta). Tästä säännöstä voidaan poiketa, jos aineen odotetaan metaboloituvan nopeasti.

NÄYTTEENOTTOAIKATAULU MINIMOIDUSSA TUTKIMUSJÄRJESTELYSSÄ

Kalanäytteiden otto

Kalanäytteitä otetaan vain neljästä näytteenottopisteestä:

— Näytteet otetaan kertymävaiheen keskivaiheessa ja lopussa (viimeksi mainittu on samalla poistumavaiheen alku), eli 14 ja 28 vuorokauden kuluttua (33).

— Näytteet otetaan poistumavaiheen keskivaiheessa ja tutkimuksen päättyessä (kun aineen pitoisuus on < 10 prosenttia enimmäispitoisuudesta tai aineen puoliintumisaika on selvästi ohitettu), eli poistumavaiheen kestettyä seitsemän ja 14 vuorokautta (33). Jos poistuman odotetaan olevan nopea tai se havaitaan nopeaksi, poistumavaihetta voidaan joutua lyhentämään sen välttämiseksi, että pitoisuudet kaloissa laskevat kvantifiointirajan alapuolelle.

— Rasvapitoisuus mitataan samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

— Kasvu korjataan samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

— BCF lasketaan kineettisenä BCF-arvona.

Vesinäytteiden otto

Minimoidussa testissä vesinäytteet otetaan samalla tavalla kuin kattavassa tutkimuksessa (ks. 54 kohta) tai vähintään viisi kertaa säännöllisin väliajoin kertymävaiheessa ja viikoittain poistumavaiheessa.

([1]) Minimoitua testiä voidaan käyttää nopean metaboloitumisen osoittamiseksi, jos sen tiedetään olevan todennäköistä.

Testijärjestelyä koskevat muutokset

Testiaineen ominaisuudet, pätevät QSAR-ennusteet ja tutkimuksen tarkoituksen huomioon ottaen tutkimusjärjestelyihin voidaan tehdä joitakin muutoksia:

— Jos tulosten on oltava tarkempia, kertymävaiheen lopuksi otettavissa näytteissä voidaan käyttää enemmän kaloja (neljän sijasta kuusi tai kahdeksan kalaa).

— Ylimääräistä kalaryhmää käytetään, jos poistuma ei ole 14 vuorokauden kuluttua (tai poistumavaiheen ennustetun päättymisen jälkeen) riittävä asianmukaisen poistuman varmistamiseksi (eli se on > 50 prosenttia). Jos poistumavaihe on ennakoitua lyhyempi tai pidempi kuin 14 vuorokautta, näytteenottoaikataulua muutetaan tämän mukaisesti (eli yksi kalaryhmä analysoidaan poistumavaiheen ennustettuna päättymisajankohtana ja toinen, kun on kulunut puolet poistumaan kuluneesta ajasta).

— Testissä käytetään kahta pitoisuutta mahdollisen pitoisuusriippuvuuden määrittämiseksi. Jos kahdella pitoisuudella tehdyn minimoidun testin tulokset osoittavat, ettei BCF riipu pitoisuudesta (eli ero on alle 20 prosenttia), mahdollisessa kattavassa testissä voidaan testata vain yksi pitoisuus.

— Vaikuttaa todennäköiseltä, että Arnot *et al.*:in (35) ehdottamia bioakkumulaatioprosessien malleja voidaan käyttää apuna kertymä- ja poistumavaiheiden keston suunnittelussa (ks. myös liite 5).

Laskutoimitukset

Tämän lähestymistavan perusteena on, että kattavassa testissä biokertyvyystekijä voidaan määrittää joko tasapainotilan biokertyvyystekijänä (BCF_{SS}) vertaamalla toisiinsa testiaineen pitoisuutta kaloissa ja vedessä tai kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) laskemalla kertymävakion k_1 ja poistumavakion k_2 välinen suhde. BCF_K on pätevä siinäkin tapauksessa, ettei aineen pitoisuudessa saavuteta kertymävaiheen aikana tasapainotilaa, mikäli kertymä ja poistuma noudattavat likimäärin ensimmäisen asteen kineettisiä prosesseja. Kertymä- ja poistumavakioiden arviointi edellyttää aina vähintään kahta datapistettä, joista toinen on kertymävaiheen päättymisajankohta (ja samalla poistumavaiheen alkamisajankohta) ja toinen poistumavaiheen päättymisajankohta (tai ajankohta, jona poistumavaihe on edennyt huomattavan pitkälle). Välinäytteiden ottaminen on suositeltavaa kertymä- ja poistumavaiheen kinetiikan tarkistamiseksi ([1]). Katso laskentamenetelmät liitteistä 5 ja 6.

Tulosten tulkinta

Testin hyväksyttävyyden ja saatujen tietojen arvon arviointi edellyttää, että poistumavaihe on pidempi kuin puoliintumisaika. Lisäksi BCF_{Km}-arvoa (minimoidun testin perusteella johdettu kineettinen BCF) pitäisi verrata minimoituun BCF_{SS}-arvoon. (Viimeksi mainittu on kertymävaiheen lopuksi laskettu BCF_{SS}, mikäli oletuksena on, että tasapainotila on saavutettu. Tämä on vain oletus, koska näytteenottopisteiden määrä ei riitä vahvistamaan tietoa.) Jos BCF_{Km} < minimoitu BCF_{SS}, käytetään mieluummin minimoitua BCF_{SS}-arvoa. Jos BCF_{Km} on pienempi kuin 70 prosenttia minimoidusta BCF_{SS}-arvosta, tulokset eivät ole päteviä ja on tehtävä kattava testi.

Jos minimoidussa testissä määritetty BCF_{Km} vastaa sääntelyn näkökulmasta huolestuttavaa arvoa, on tehtävä kattava testi. Jos tulos on kaukana lainsäädännössä annetuista huolestuttavista arvoista (selvästi niiden ylä- tai alapuolella), kattavaa testiä ei välttämättä tarvita tai kattavassa testissä voidaan käyttää vain yhtä pitoisuutta, jos sovellettavassa sääntelykehyksessä edellytetään kattavaa testiä.

Jos kattava testi katsotaan tarpeelliseksi yhdellä pitoisuudella tehdyn minimoidun testin perusteella, se voidaan tehdä toisella pitoisuudella. Jos tulokset ovat johdonmukaisia, kattavaa testiä ei ole välttämätöntä tehdä erilaisella pitoisuudella, koska kyseisen aineen biokertyvyyden ei odoteta riippuvan pitoisuudesta. Jos minimoidussa testissä on käytetty kahta pitoisuutta eikä kertyvyys ole tulosten perusteella riippuvainen pitoisuudesta, kattavassa testissä voidaan testata vain yksi pitoisuus (ks. 87 kohta).

([1]) Jos testissä käytetään vain kahta datapistettä, BCF_{Km}-arvo voidaan arvioida bootstrap-menetelmien avulla. Jos näytteitä otetaan myös välidatapisteistä, BCF_{Km}:n luottamusvälit voidaan laskea samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

Testiraportti

Minimoitua testiä koskevan testiraportin pitäisi sisältää kaikki samat tiedot kuin kattavan testin seloste (ks. 81 kohta) lukuun ottamatta tietoja, joita ei ole mahdollista antaa (kuten käyrä, joka osoittaa tasapainotilan saavuttamiseen kuluneen ajan ja tasapainotilan biokertyvyystekijän; viimeksi mainitusta pitäisikin ilmoittaa minimoitu BCF_{ss}). Testiraportin pitäisi lisäksi sisältää perustelut minimoidun testin toteuttamiselle sekä sen perusteella saatu BCF_{Km}-arvo.

C.13 – III: **Bioakkumulaation testaaminen kaloilla ravintoaltistuksessa**

JOHDANTO

Tässä osiossa kuvattua menetelmää olisi käytettävä aineilla, joiden testauksessa ei voida soveltaa vesialtistusta (esimerkiksi siksi, ettei vesipitoisuutta voida pitää stabiilina ja mitattavana tai ettei kertymä ole riittävä 60 vuorokauden altistuksessa; katso edeltävät osiot, joissa käsitellään vesialtistusmenetelmää). On kuitenkin ymmärrettävä, että tämän testin lopputuloksena saadaan ennemminkin ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (BMF) kuin biokertyvyystekijä (BCF) ([1]).

Toukokuussa 2001 Madridissa pidetyssä SETAC Europen konferenssissa esiteltiin uusi menetelmä heikosti veteen liukenevien orgaanisten aineiden bioakkumulaation testaamiseksi (36). Menetelmä perustuu lukuisiin kirjallisuudessa käsiteltyihin bioakkumulaatiotutkimuksiin, joissa on käytetty testiainetta sisältävän rehun annostelumenetelmää (esim. (37)). Vuoden 2004 alkupuolella EU:n hitaasti hajoavia, biokertyviä ja myrkyllisiä aineita käsittelevälle työryhmälle esiteltiin pöytäkirjaluonnos (38), jossa käsiteltiin sellaisten vesiliukoisten orgaanisten aineiden bioakkumulaatiopotentiaalin määrittämistä, joiden biokertyvyyttä ei voitu selvittää standardilla vesialtistusmenetelmällä, sekä kyseisen pöytäkirjaluonnoksen valmisteluasiakirjat (39). Kyseisen menetelmän käyttöä perusteltiin lisäksi sillä, että altistuminen tällaisille niukkaliukoisille aineille (joiden log K_{OW} >5) saattaa tapahtua ympäristössä pääosin ravinnon välityksellä (ks. (40) (41) (42) (43) (44)). Näin ollen joissakin julkaistuissa kemikaaliasetuksissa viitataan ravinnon välityksellä tehtäviin altistustesteihin ([2]). Pitäisi kuitenkin huomata, että tässä osiossa kuvatussa menetelmässä vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksessa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Tässä osiossa käsiteltävä testimenetelmä perustuu mainittuun pöytäkirjaan (38). Kyse on uudesta menetelmästä, joka ei ollut mukana testimenetelmän C.13 edellisessä versiossa. Tässä vaihtoehtoisessa testissä ravinnon välityksellä tapahtuvaa altistumista voidaan tutkia suoraan valvotuissa laboratorio-oloissa.

Tutkijoiden pitäisi lukea tämän testimenetelmän kohdat 1–14, joissa annetaan tietoa siitä, milloin ravinnon välityksellä tehtävä altistus voi olla suositeltavampi kuin vesialtistus. Lisäksi annetaan tietoa erilaisista aineisiin liittyvistä näkökohdista, jotka pitäisi ottaa huomioon ennen testin aloittamista.

Radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöä voidaan harkita samoin perustein kuin vesialtistusmenetelmässä (ks. 6 ja 65 kohta).

Ravinnon välityksellä tehtävässä altistuksessa voidaan testata kerralla useampaa kuin yhtä ainetta, jos tietyt edellytykset täyttyvät. Näitä edellytyksiä käsitellään tarkemmin 112 kohdassa. Yksinkertaisuuden nimissä tässä kuvataan kyseistä menetelmää vain yhtä ainetta testattaessa.

Ravinnon välityksellä tehtävä altistus on monessa suhteessa samanlainen kuin vesialtistus, mutta altistumisreitti on luonnollisesti eri. Näin ollen tässä kuvattuun menetelmään pätevät monet samat huomiot kuin edellisessä osiossa kuvattuun vesialtistusmenetelmään. Edellisen osion olennaisiin kohtiin on pyritty viittaamaan niin paljon kuin mahdollista, mutta luettavuuden ja ymmärrettävyyden varmistamiseksi kaikkia päällekkäisyyksiä ei ole voitu välttää.

([1]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.
([2]) Kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 (EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1) täytäntöönpanoa varten tätä kysymystä käsitellään tietovaatimuksia ja kemikaaliturvallisuusarviointia koskevissa ohjeissa (Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment), luvuissa R.7 c, R.7.10.3.1, s. 13; R.7.10.4.1, s. 31–32 ja kuvassa R7.10-2, s. 50.

TESTIN PERIAATE

Testissä voidaan käyttää läpivirtausta tai puolistaattista menetelmää (ks. 4 kohta). Läpivirtausmenetelmää suositellaan, jotta vältettäisiin mahdollinen altistuminen veden välityksellä, joka johtuu testiainetta sisältävän rehun lisäämisestä tai ulosteista. Testi on kaksivaiheinen: kertymävaihe (kaloille annetaan testiainetta sisältävää rehua) ja poistumavaihe (annettava rehu on puhdasta ja käsittelemätöntä) (ks. 16 kohta). Kertymävaiheessa testiryhmän kaloja ruokitaan päivittäin tietyllä kaupallisesti saatavalla kalanruoalla, jonka koostumus tunnetaan ja johon on lisätty testiainetta. Ideaalitilanteessa kalat syövät kaiken annetun ruoan (ks. 141 kohta). Poistumavaiheessa kaloja ruokitaan puhtaalla ja käsittelemättömällä kaupallisesti saatavalla kalanruoalla. Kuten vesialtistuksessa, tarvittaessa voidaan käyttää useampaa kuin yhtä testiryhmää, joille annettava ruoka sisältää eri pitoisuuksia testiainetta, mutta erittäin hydrofobisia orgaanisia aineita testattaessa yksi testiryhmä on yleensä riittävä (ks. 49 ja 107 kohta). Jos käytetään puolistaattista menetelmää, kalat pitäisi siirtää uuteen liuokseen ja/tai uuteen testikammioon kertymävaiheen päätyttyä (siltä varalta, että väliaine ja/tai laitteisto on kontaminoitunut testiaineen uuttumisen seurauksena). Testiaineen pitoisuus kaloissa mitataan testin molempien vaiheiden aikana. Testiainetta sisältävää ruokaa saavan kalaryhmän (testiryhmä) lisäksi pidetään vertailuryhmää, jonka kalat elävät täysin samanlaisissa olosuhteissa ja saavat muuten samaa kaupallisesti saatavaa kalanruokaa, paitsi että vertailuryhmän ruokaan ei ole lisätty testiainetta. Vertailuryhmän ansiosta voidaan kvantifioida testiaineen taustapitoisuudet altistamattomilla kaloilla ja testiryhmässä (tai -ryhmissä) mahdollisesti havaittuja käsittelyyn liittyviä haittavaikutuksia voidaan verrata siihen ([1]). Lisäksi sen avulla voidaan verrata ryhmien kasvuvakioita sen tarkistamiseksi, että kalat ovat syöneet saman verran tarjottua ruokaa (mahdolliset erot ravinnon maittavuudessa pitäisi myös huomioida selitettäessä kasvuvakioiden välisiä eroja; ks. 138 kohta). On tärkeää, että testi- ja vertailuryhmiä ruokitaan sekä kertymä- että poistumavaiheessa ravintoarvoltaan samanlaisella ruoalla.

Testimenetelmän kehittäjien saamien kokemusten perusteella kertymävaiheen riittävä kesto on yleensä 7–14 vuorokautta (38) (39). Tämän pituisena kertymävaiheen pitäisi pitää testin toteuttamiskustannukset mahdollisimman pieninä mutta varmistaa kuitenkin useimmilla aineilla riittävä altistuminen. Joissakin tapauksissa kertymävaihetta voidaan kuitenkin jatkaa (ks. 127 kohta). Kertymävaiheessa aineen pitoisuus kaloissa ei ehkä saavuta tasapainotilaa, joten tietojen käsittely ja tällä menetelmällä saatavat tulokset perustuvat tavallisesti kudosjäämien kineettisen analyysin tuloksiin. (Huom. tasapainotilan saavuttamiseen kuluvan ajan arvioinnissa voidaan soveltaa samoja yhtälöitä kuin vesialtistuksessa, ks. liite 5.) Poistumavaihe alkaa, kun kaloille aletaan antaa ruokaa, johon ei ole lisätty testiainetta. Se kestää yleensä enimmillään 28 vuorokautta tai niin kauan, ettei testiainetta enää voida kvantifioida kokonaisesta kalasta, riippuen siitä, kumpi tapahtuu aiemmin. Poistumavaihetta voidaan lyhentää tai jatkaa kauemmin kuin 28 vuorokautta eri vaiheissa mitattua kemikaalipitoisuutta koskevan muutoksen tai kalojen koon perusteella.

Tässä menetelmässä on mahdollista määrittää testiaineelle ainekohtainen puoliintumisaika ($t_{1/2}$, poistumavakiosta k_2), assimilaatioteho (absorboituminen suolistossa; a), ravintoon liittyvä kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_K), kasvukorjattu ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (BMF_{Kg}) sekä rasvapitoisuuden mukaan korjattu ([2]) kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_{KL}) (ja/tai kasvun ja rasvapitoisuuden mukaan korjattu kineettinen biomagnifikaatiokerroin, BMF_{KgL}) kaloissa. Kuten vesialtistusmenetelmässä, kalan massan kasvaessa testin aikana testiaineen pitoisuus laskee kasvavassa kalassa. Näin ollen (kineettinen) BCF määritetään liian alhaiseksi, jollei sitä korjata kasvun mukaisesti (ks. 162 ja 163 kohta). Jos arvioidaan, että tasapainotila on saavutettu kertymävaiheessa, voidaan lisäksi laskea suuntaa-antava tasapainotilan BMF. Käytettävissä on menetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ravintotutkimuksessa saatujen tietojen perusteella (esim. (44) (45) (46) (47) (48). Näiden menetelmien hyviä ja huonoja puolia käsitellään lisäyksessä 8.

Testi suunniteltiin alun perin niukkaliukoisille polaarittomille orgaanisille aineille, jotka noudattavat likimääräisesti ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa kaloissa. Jos testataan ainetta, joka ei noudata ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. lisäyksessä 5 olevat viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta.

([1]) Useimmilla testiaineilla niitä ei pitäisi ideaalitilanteessa löytyä kontrollivedestä. Taustapitoisuuksilla pitäisi olla merkitystä vain luonnossa esiintyvien materiaalien (kuten joidenkin metallien) ja kaikkialla ympäristössä olevien aineiden kannalta.

([2]) Koska BMF määritetään jonkin aineen pitoisuutena organismissa suhteessa saman aineen pitoisuuteen organismin ravinnossa tasapainotilassa, rasvaisuus otetaan huomioon korjaamalla organismin ja ravinnon rasvapitoisuus. Näin ollen se on parempi ilmoittaa "korjattuna". Tämä lähestymistapa eroaa "normalisoinnista" kyseisen organismin normaalin rasvapitoisuuden mukaisesti, mitä käytetään veden välityksellä tehtävässä biokertyvyystestissä.

BMF määritetään tavallisesti analysoimalla testiaine kokonaisesta kalasta (perusteena tuorepaino). Näytteitä voidaan ottaa myös yksittäisistä kudoksista (kuten lihaksista tai maksasta), jos se on tutkimuksen tavoitteiden kannalta olennaista ja kala on jaettu syötävään ja syömäkelvottomaan osaan (ks. 21 kohta). Lisäksi voidaan irrottaa ja analysoida erikseen ruoansulatuskanava, jotta voitaisiin määrittää näytteenottopisteissä mitattujen pitoisuuksien merkitys kokonaisessa kalassa kertymävaiheen lopussa ja juuri ennen poistumavaiheen alkua. Tämä voidaan tehdä myös osana massatasemenetelmää.

Näytteeksi otettujen kokonaisten kalojen rasvapitoisuus pitäisi määrittää siten, että pitoisuudet voidaan korjata rasvapitoisuuden mukaisesti ja ottaen huomioon sekä ravinnon että kalan rasvapitoisuus (ks. 56 ja 57 kohta sekä liite 7).

Näytteeksi otetut kalat pitäisi punnita ja saadut painot kirjata ja liittää kussakin yksilössä mitattuun kemikaalipitoisuuteen (testiraportissa voidaan esimerkiksi käyttää jokaisesta kalasta yksilöllistä tunnistetta). Tämä mahdollistaa testin aikana mahdollisesti tapahtuvan kasvun laskemisen. Kalan kokonaispituus pitäisi mitata aina kuin mahdollista ([1]). Painoa tarvitaan myös arvioitaessa BCF:ää ravintoaltistustestissä saatujen poistumatietojen perusteella.

TESTIAINEEN TIEDOT

Testiaineesta pitäisi olla saatavilla kohdissa 3 ja 22 luetellut tiedot. Analyyttista menetelmää testiaineen pitoisuuden mittaamiseksi vedessä ei yleensä tarvita. Sen sijaan pitoisuudet kalanruoassa ja kalojen kudoksissa on määritettävä riittävän herkillä menetelmillä.

Tässä menetelmässä voidaan testata yhdellä kertaa useampia kuin yksi aine. Testiaineiden pitäisi kuitenkin olla yhteensopivia niin, etteivät ne vaikuta toisiinsa tai muuta toistensa kemiallista koostumusta, kun niitä lisätään kalanruokaan. Tavoitteena on varmistaa, etteivät yhdessä testattujen aineiden mittaustulokset eroaisi merkittävästi tuloksista, jotka saataisiin, jos aineet testattaisiin erikseen. Alustavassa analyysissa pitäisi osoittaa, että kukin aine voidaan erottaa useita testiaineita sisältävästä ravinnosta ja kaloista otetuista kudosnäytteistä siten, että i) saannot ovat suuria (esimerkiksi > 85 prosenttia nimellisarvosta) ja ii) ne ovat riittävän herkkiä testattavaksi. Yhdessä testattavien aineiden kokonaisannostuksen pitäisi olla pienempi kuin se yhdistetty pitoisuus, joka voisi olla myrkyllinen (ks. 51 kohta). Lisäksi testijärjestelyissä pitäisi huomioida mahdolliset haittavaikutukset kaloille ja aineiden mahdolliset yhteisvaikutukset (esimerkiksi metaboliset vaikutukset), jotka liitetään useiden aineiden samanaikaiseen testaamiseen. Ionisoituvien aineiden samanaikaista testaamista pitäisi välttää. Altistumisen näkökulmasta tätä menetelmää voidaan käyttää myös monimutkaisten seosten testaamisessa (ks. 13 kohta), vaikka sitä koskevat samat rajoitukset kuin muissa menetelmissä.

TESTIN VALIDITEETTI

Testi on luotettava, jos seuraavat edellytykset täyttyvät (ks. 24 kohta):

— Veden lämpötilan vaihtelu sekä altistus- että vertailuryhmässä on alle ± 2 °C.

— Liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta.

— Testiaineen pitoisuus kalanruoassa ennen kertymävaihetta ja sen lopussa on ± 20 prosenttia (vähintään kolmen kumpanakin ajankohtana otetun näytteen perusteella).

— Testiaineen homogeenisuus sitä sisältävässä ruoassa pitäisi osoittaa alustavassa analyysissa; vähintään kolmen testin alussa otetun näytteen perusteella kyseisen aineen pitoisuus ei saisi vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia keskiarvosta.

([1]) Kokonaispituus pitäisi myös kirjata testin aikana, koska se on hyvä keino selvittää mahdolliset haittavaikutukset.

— Testiainetta ei havaita tai sen pitoisuus vastaa normaalia jäämien tasoa testiainetta sisältämättömässä ruoassa tai vertailukalojen kudoksissa altistetuista kaloista otettuihin näytteisiin verrattuna.

— Sekä vertailu- että testiryhmien kalojen kuolleisuus tai haittavaikutusten/sairauksien määrä on ≤ 10 prosenttia testin lopussa. Jos testin kestoa on jostain syystä jatkettava, haittavaikutusten määrä on ≤ 5 prosenttia kuukaudessa ja ≤ 30 prosenttia kumulatiivisesti. Merkittävä ero testi- ja vertailukalojen keskimääräisessä kasvussa saattaa olla merkki testiaineen toksisuudesta.

VERTAILUAINEET

Jos laboratorio ei ole tehnyt määritystä aikaisemmin tai jos on tehty huomattavia muutoksia (esimerkiksi kalakannan tai toimittajan vaihto, kalalajin vaihtaminen tai merkittävä muutos kalojen koossa, kalojen ruoassa tai testiaineen lisäysmenetelmässä), on syytä tehdä tekninen pätevyystutkimus vertailuainetta käyttäen. Vertailuainetta käytetään pääasiassa sen määrittämiseksi, onko valittu menetelmä testiaineen lisäämiseksi ruokaan sellainen, että sillä voidaan varmistaa mahdollisimman hyvin testiaineiden homogeenisuus ja biologinen hyötyosuus. Polaarittomilla hydrofobisilla aineilla on käytetty esimerkiksi heksaklooribentseenia (HCB), mutta HCB:n vaarallisuuden takia pitäisi harkita muiden sellaisten aineiden käyttöä, joiden kertymisestä ja biomagnifikaatiosta on luotettavaa tietoa ([1]). Jos käytetään vertailuainetta, siitä pitäisi ilmoittaa testiraportissa samat perustiedot kuin testiaineista, eli aineen nimi, puhtaus, CAS-numero, rakenne ja myrkyllisyystiedot (jos saatavilla) (ks. 3 ja 22 kohta).

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Materiaaleja ja laitteistoa pitäisi käyttää samalla tavalla kuin veden välityksellä tehtävässä altistuksessa (ks. 26 kohta). Testissä pitäisi käyttää läpivirtausmenetelmää tai staattista ajoittaisvaihtoista järjestelmää, jolla varmistetaan laimennusveden riittävä määrä testisäiliöissä. Virtausnopeudet on kirjattava muistiin.

Vesi

Testivettä pitäisi käyttää samalla tavalla kuin vesialtistuksessa (ks. 27–29 kohta). Väliaineen on oltava ominaisuuksiltaan kuvatun kaltaista ja sen pitäisi pysyä laadultaan samana koko testin ajan. Luonnosta peräisin olevien hiukkasten pitoisuuden ja orgaanisen hiilen kokonaismäärän pitäisi olla ennen testin alkamista mahdollisimman alhainen (hiukkasia ≤ 5 mg/l ja orgaanisen hiilen kokonaismäärä ≤ 2 mg/l). Orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC) mitataan vain ennen testin alkua testiveden ominaisuuksia määritettäessä (ks. 53 kohta).

Ruokavalio

Suositeltavaa on antaa kaupallisesti saatavaa kalanruokaa (kelluvat ja/tai hitaasti uppoavat hiutaleet), joka sisältää vähintään valkuaisaineita ja rasvaa. Ruokahiutaleiden pitäisi olla kooltaan yhdenmukaisia ravinnon välityksellä tapahtuvan altistuksen tehokkuuden voimistamiseksi, jotta kalat söisivät enemmän sen sijaan, että syövät vain suuremmat hiutaleet ja jättävät pienemmät syömättä. Hiutaleiden pitäisi olla testin alussa sopivan kokoisia kalojen kokoon nähden (esimerkiksi jos kalojen kokonaispituus on 3–7 cm, hiutaleiden halkaisija voi olla noin 0,6–0,85 mm, ja jos kalojen kokonaispituus on 6–12 cm, hiutaleiden halkaisija voi olla noin 0,85–1,2 mm). Hiutaleiden kokoa voidaan muuttaa kalojen kasvun mukaan poistumavaiheen alkaessa. Sopivasta kaupallisesti saatavasta ruoasta annetaan esimerkki lisäyksessä 7. Tätä menetelmää kehitettäessä käytetyn ruokavalion kokonaisrasvapitoisuus oli 15–20 prosenttia (tuorepaino). Joillakin alueilla ei välttämättä ole saatavilla kalanruokaa, jonka rasvapitoisuus on näin suuri. Tällöin tutkimuksessa käytetään ruokaa, jonka rasvapitoisuus on pienempi, ja tarvittaessa ruokkimistaajuutta muutetaan sen mukaan kalojen terveyden ylläpitämiseksi (alustavan testin perusteella). Testi- ja vertailuryhmien kalojen kokonaisrasvapitoisuus on määritettävä ja kirjattava muistiin ennen testin alkua sekä kertymävaiheen lopussa. Kaupallisen rehun valmistajan ilmoittamat tiedot ruoan sisältämistä ravintoaineista, kosteuspitoisuudesta, kuiduista ja tuhkasta ja mahdollisuuksien mukaan myös kivennäisaineista ja torjuntaainejäämistä on esitettävä testiraportissa.

([1]) HCB mainitaan Tukholman yleissopimuksen liitteissä A ja C sekä pysyvistä orgaanisista yhdisteistä annetun asetuksen (EY) N:o 850/2004 (EUVL L 158, 30.4.2004, s. 7) liitteissä I ja III olevissa luetteloissa.

Testiainetta on lisättävä ruokaan siten, että ruoka olisi mahdollisimman homogeenista koko testin ajan. Testiryhmälle annettavan ruoan sisältämän testiainepitoisuuden määrittämisessä on huomioitava analyysitekniikan herkkyys, testiaineen myrkyllisyys (NOEC-arvo, jos se on tiedossa) sekä olennaiset fysikaalis-kemialliset tiedot. Jos käytetään vertailuainetta, se pitäisi lisätä testiaineen pitoisuuden ollessa noin 10 prosenttia (tai joka tapauksessa niin pieni kuin on käytännössä mahdollista) riippuen analyysin herkkyydestä (esim. heksaklooribentseenin hyväksyttäväksi pitoisuudeksi ruoassa on todettu 1–100 µg/g; lisätietoa HCB:n assimilaatiotehosta on 47 kohdassa).

Testiaine voidaan lisätä kalanruokaan eri tavoin riippuen sen fyysisistä ominaisuuksista ja liukoisuudesta (ks. lisätietoa lisäämismenetelmistä lisäyksestä 7).

— Jos aine on liukenevaa ja sen triglyseridiarvot vakaita, se olisi liuotettava pieneen määrään kalaöljyä tai syötävää kasviöljyä ennen kuin se sekoitetaan kalanruokaan. Tässä vaiheessa pitää olla tarkkana, ettei rasvojen osuus kasva liian suureksi ottaen huomioon testirehun luonnollisen rasvapitoisuuden. Tämä tehdään lisäämällä pienin mahdollinen määrä öljyä, jonka tiedetään varmistavan testiaineen leviäminen ja homogeenisuus ruoassa.

— Aine olisi lisättävä ruokaan käyttämällä sopivaa orgaanista liuotinta, kunhan homogeenisuus ja biologinen hyötyosuus eivät kärsi (testiaineesta saattaa muodostua ruokaan (mikro)kiteitä liuotinaineen haihtuessa, mutta tätä ei ole helppoa osoittaa; ks. (49)).

— Ei-viskoosit nesteet olisi lisättävä kalanruokaan suoraan, mutta ne on sekoitettava hyvin ruoan homogeenisuuden varmistamiseksi ja assimilaation helpottamiseksi. Sekoitustekniikalla pitäisi varmistaa testiainetta sisältävän rehun homogeenisuus.

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi testattaessa vähemmän hydrofobisia aineita, joita desorboituu ruoasta helpommin, voi olla tarpeen valella valmiit ruokahiutaleet pienellä määrällä maissi- tai kalaöljyä (ks. 142 kohta). Tällöin vertailuruoka on käsiteltävä samalla tavalla ja rasvapitoisuus määritettävä valmiin testirehun avulla.

Jos käytetään vertailuainetta, sitä koskevien tulosten on oltava verrattavissa samanlaisissa olosuhteissa toteutettuja ja samaa ruokkimistaajuutta soveltavia tutkimuksia koskeviin tietoihin (ks. 45 kohta). Tiettyä vertailuainetta koskevien muuttujien pitäisi myös täyttää olennaiset perusteet, jotka mainitaan 113 kohdassa (alakohdat 3, 4 ja 5).

Jos testiaineen lisäämisessä käytetään kantaja-aineena öljyä tai liuotinainetta, samaa kantaja-ainetta olisi sekoitettava sama määrä (ilman testiainetta) vertailuryhmän ruokavalioon, jotta se vastaisi testiainetta sisältävää ruokavaliota. On tärkeää, että testi- ja vertailuryhmiä ruokitaan sekä kertymä- että poistumavaiheessa ravintoarvoltaan samanlaisella ruoalla.

Testiainetta sisältävä ruoka olisi varastoitava siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana. Varastointiolosuhteet on ilmoitettava testiraportissa.

Kalalajin valinta

Käytettävät kalalajit voivat olla samoja kuin vesialtistuksessa (ks. 32 kohta ja lisäys 3). Ruokavalion välityksellä tehtävissä bioakkumulaatiotutkimuksissa yleisesti käytetyt kalalajit ennen tämän testimenetelmän julkaisua ovat olleet kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*), karppi (*Cyprinus carpio*) ja paksupäämutu (*Pimephales promelas*). Testattavien lajien ruokailutottumusten olisi oltava sellaiset, että kalat syövät nopeasti saamansa ruoka-annoksen, jotta testiaineen pitoisuuteen ruoassa mahdollisesti vaikuttavat tekijät (kuten uuttuminen veteen ja mahdollinen altistuminen veden välityksellä) voitaisiin pitää mahdollisimman vähäisinä. Testissä olisi käytettävä kaloja, joiden koko ja paino ovat suositusten mukaiset (ks. lisäys 3). Kalojen olisi oltava niin suuria, että yksittäisten kalojen analysointi onnistuu helposti. Kalalajien testaaminen nopean kasvun vaiheessa voi hankaloittaa tietojen tulkintaa, ja nopea kasvu voi vaikuttaa assimilaatiotehon laskemiseen ([1]).

([1]) Kertymävaiheessa tapahtuvan nopean kasvun takia todellinen ruokkimistaajuus laskee altistuksen alussa määritettyä pienemmäksi.

Kalojen hoito

Totuttamista, kuolleisuutta ja sairauksia koskevat hyväksyntäperusteet, joita sovelletaan ennen testin suorittamista, ovat samat kuin vesialtistuksessa (ks. 33–35 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Tutkimuksen valmistelu ja alueenmääritystesti

Ennen varsinaista tutkimusta on tehtävä analyyseja, joilla osoitetaan testiaineen saannot testiainetta sisältävästä ruoasta / testiainetta sisältävää ruokaa saaneiden kalojen kudoksista. Aina ei ole välttämätöntä tehdä alueenmääritystestiä sen määrittämiseksi, mikä on aineen sopiva pitoisuus ruoassa. Alustavien ruokintakokeiden avulla voidaan osoittaa, ettei haittavaikutuksia ole havaittavissa, arvioida testiainetta sisältävän ruokavalion maittavuutta ja kalojen kudosten ja ravinnon analysoinnissa käytetyn menetelmän herkkyyttä sekä valita sopiva ruokkimistaajuus ja näytteenottovälit poistumavaiheessa. Niiden toteuttaminen ei kuitenkaan ole pakollista. Esitutkimuksesta voi olla hyötyä sen arvioimisessa, minkä verran kaloja näytteenotossa tarvitaan poistumavaiheen aikana. Käytettyjen kalojen määrää voidaan näin vähentää huomattavasti etenkin sellaisten testiaineiden osalta, jotka ovat erityisen alttiita metaboloitumaan.

Altistusolosuhteet

Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen riittävä kesto on tavallisesti 7–14 vuorokautta, joiden ajan yhdelle kalaryhmälle annetaan päivittäin vertailuruokaa ja toiselle testiruokaa ennalta määrätty annos, jonka suuruus riippuu testattavasta lajista ja kokeen olosuhteista. Esimerkiksi kirjolohella annos on 1–2 prosenttia ruumiinpainosta (tuorepaino). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Kertymävaihetta voidaan tarvittaessa pidentää aiemmista tutkimuksista saatujen kokemusten tai testiaineen (tai sitä vastaavan aineen) kertymistä/poistumista kalassa koskevien tietojen perusteella. Testin katsotaan alkavan, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Yksi testivuorokausi alkaa ruokintahetkestä ja päättyy vähän (esimerkiksi tuntia) ennen seuraavaa ruokintaa. Ensimmäinen testivuorokausi alkaa siis siitä, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa, ja päättyy juuri ennen hetkeä, jolloin kaloille annetaan toisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Käytännössä kertymävaihe päättyy vähän (esimerkiksi tuntia) ennen sitä, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa, koska testiainetta sisältävää ruokaa on kalojen ruoansulatusjärjestelmässä ja se absorboituu kaloihin noin 24 tunnin ajan. On tärkeää varmistaa, että testiaineen (ei-myrkyllinen) kertymä kaloissa on riittävän suuri analyysimenetelmään nähden, jotta poistumavaiheessa voidaan mitata vähintään yhden suuruusluokan aleneminen. Erityistapauksissa voidaan soveltaa pidempää kertymävaihetta (enintään 28 vuorokautta), jolloin myös otetaan lisänäytteitä kertymäkinetiikan arvioimiseksi. Pitoisuus kalassa ei välttämättä saavuta tasapainotilaa kertymävaiheen aikana. Tasapainotilan ja samalla hyväksyttävän pitoisuuden saavuttamiseen kuluvan ajan arvioimisessa voidaan käyttää samoja yhtälöitä kuin vesialtistustestissä (ks. liite 5).

Joissakin tapauksissa tiedetään jo etukäteen, ettei ainetta kerry ravinnon välityksellä tarpeeksi 7–14 vuorokaudessa valitulla pitoisuudella riittävän suuren pitoisuuden saavuttamiseksi kaloissa, jotta voitaisiin analysoida vähintään yhden suuruusluokan aleneminen poistumavaiheessa. Tämä voi johtua siitä, ettei analyysitekniikka ole kovin herkkä, tai siitä, että assimilaatioteho on alhainen. Tällöin voi olla järkevää jatkaa ensimmäistä ruokintavaihetta kauemmin kuin 14 vuorokautta tai vaihtoehtoisesti pitäisi harkita, etenkin helposti metaboloituvilla aineilla, pitoisuuden nostamista ravinnossa. On kuitenkin huolehdittava siitä, ettei kalojen kudoksiin kertyneen aineen määrä ylitä kertymävaiheessa sitä (arvioitua) rajaa, jota alempi pitoisuus ei aiheuta havaittavaa kroonista vaikutusta (NOEC) (ks. 138 kohta).

Poistumavaiheen kesto

Poistumavaihe kestää yleensä korkeintaan 28 vuorokautta. Se alkaa, kun testiryhmän kaloille aletaan antaa kertymävaiheen jälkeen käsittelemätöntä ruokaa. Poistumavaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäistä kertaa testiainetta sisältämätöntä ruokaa, ei siis heti sen jälkeen, kun kaloille on annettu viimeisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Tämä johtuu siitä, että testiainetta sisältävää ruokaa on kalojen ruoansulatusjärjestelmässä ja se absorboituu kaloihin noin 24 tunnin ajan, kuten todetaan 126 kohdassa. Poistumavaiheen ensimmäinen näyte otetaan vähän ennen toista kertaa, kun kaloille annetaan testiainetta sisältämätöntä ruokaa. Edellä mainittu poistumavaiheen kesto on määritelty siten, että voidaan havaita aineet, joiden puoliintumisaika on enintään 14 vuorokautta, kuten biokertyvillä aineilla ([1]). Näin ollen 28 vuorokautta käsittää kyseisillä aineilla kaksi puoliintumisaikaa. Erittäin herkästi bioakkumuloituvilla aineilla voi olla hyödyllistä pidentää poistumavaihetta (jos alustava testi antaa viitteitä tästä).

Vaikka aine poistuu hyvin hitaasti eikä puoliintumisaikaa siten voida määrittää tarkasti poistumavaiheessa, tietoa voi olla riittävästi sitä varten, että bioakkumulaation arvioidaan olevan merkittävää. Jos taas aine poistuu niin nopeasti, ettei nollapitoisuuden (pitoisuus kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa, $C_{0,d}$) ajankohtaa ja k_2-arvoa voida johtaa luotettavasti, k_2 voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. liite 7).

Jos aikaisemmassa vaiheessa (esim. seitsemän tai 14 vuorokauden kuluttua) kaloista tehdyt analyysit osoittavat, ettei aineen poistuma vastaa kvantifiointirajaa ennen 28 vuorokauden täyttä ajanjaksoa, näytteenotto voidaan keskeyttää ja testi päättää.

Joissakin tapauksissa testiainetta ei ehkä ole kertynyt kertymävaiheen lopussa (tai poistumavaiheen toisena näytteenottoajankohtana) mitattavissa olevaa määrää. Jos voidaan osoittaa, että i) kohdassa 113 annetut hyväksyttävyysperusteet täyttyvät eikä ii) kertymän olemattomuus johdu testin toteuttamiseen liittyvistä puutteista (esim. kertymävaihe ei ole riittävän pitkä, testiainetta on lisätty ruokaan puutteellisella tekniikalla, minkä takia biologinen hyötyosuus on huono, analyysimenetelmä ei ole riittävän herkkä, kalat eivät syö ravintoa ja niin edelleen), tutkimus voidaan lopettaa eikä sitä tarvitse tehdä uudelleen soveltaen pidempää kertymävaihetta. Jos alustavat testit osoittavat, että näin saattaisi käydä, voidaan harkita mahdollisuuksien mukaan sulamatta jääneen testiaineen analysoimista ulosteista osana massatasemenetelmää.

Testikalojen määrä

Samoin kuin vesialtistustestissä valittujen kalojen on oltava keskenään suunnilleen samanpainoisia ja -pituisia, eli pienimmän kalan painon on oltava vähintään kaksi kolmasosaa suurimman kalan painosta (ks. 40–42 kohta).

Tutkimuksessa käytettävien kalojen kokonaismäärä on valittava näytteenottoaikataulun mukaan (vähintään yksi näyte kertymävaiheen lopussa ja neljästä kuuteen näytettä poistumavaiheen aikana). Lisäksi on otettava huomioon analyysitekniikan herkkyys, kertymävaiheen lopussa todennäköisesti saavutettava pitoisuus (aiempien tietojen perusteella) sekä poistumavaiheen kesto (jos se voidaan arvioida aiempien tietojen perusteella). Kullakin näytteenottokerralla pitäisi analysoida viidestä kymmeneen kalaa, joiden kasvu (paino ja kokonaispituus) mitataan ennen kemikaali- tai rasvapitoisuuden määrittämistä.

Kalojen koko, kasvuvauhti ja fysiologia vaihtelevat luonnostaan ja kalat syövät saamaansa ravintoa todennäköisesti eri määriä. Näin ollen näytteet pitäisi ottaa kullakin kerralla vähintään viidestä testiryhmän kalasta ja viidestä vertailuryhmän kalasta, jotta keskimääräinen pitoisuus ja sen vaihtelu voitaisiin määrittää asianmukaisesti. Käytettyjen kalojen keskuudessa esiintyvä vaihtelu vaikuttaa todennäköisesti enemmän yleiseen vaihteluun, jota ei voida testissä hallita, kuin käytettyjen analyysimenetelmien välinen luontainen vaihtelu, mikä puoltaa joissakin tapauksissa jopa kymmenen kalan käyttöä yhtä näytteenottopistettä kohti. Jos testiaineen taustapitoisuuksia ei voida mitata poistumavaiheen alussa, kemiallisen analyysin tekeminen viimeisenä näytteenottoajankohtana kahdesta tai kolmesta vertailuryhmän kalasta saattaa riittää, kunhan lopuilta vertailuryhmän kaloilta mitataan paino ja kokonaispituus kaikissa näytteenottopisteissä (siten, että kasvu mitataan yhtä suurelta määrältä testi- ja vertailuryhmän kaloja). Kalat pitäisi varastoida ja punnita yksitellen (vaikka näytteenoton tulokset olisi myöhemmin yhdistettävä), ja niiltä pitäisi mitata kokonaispituus.

([1]) Veden välityksellä tehtävässä altistustutkimuksessa 14 vuorokauden puoliintumisaika vastaisi BCF-arvoa, joka on noin 10 000 L/kg, kun käytetään noin gramman painoisia kaloja, joiden kertymävakio on noin 500 L/kg/pv (Sijm *et al*:n yhtälön mukaisesti(46)).

Standarditestissä, jossa poistumavaihe kestää 28 vuorokautta ja poistumavaiheen aikana otetaan viisi näytettä, tämä esimerkiksi tarkoittaa, että näyte otetaan kaikkiaan 59–120:stä testiryhmän kalasta ja 50–110:stä vertailuryhmien kalasta olettaen, että kyseisen aineen analyysitekniikka mahdollistaa rasvapitoisuuden analysoinnin samoista kaloista. Jos rasvapitoisuutta ja kemikaalipitoisuutta ei voida analysoida samoista kaloista eikä vertailuryhmien kalojen käyttö pelkästään rasvapitoisuuden analysoimiseksi ole mahdollista (ks. 56 kohta), näytteenottoon saatetaan tarvita 15 kalaa enemmän (kolme kalaa kantapopulaatiosta testin alussa, kolme kalaa sekä testi- että vertailuryhmästä poistumavaiheen alussa ja kolme kalaa sekä testi- että vertailuryhmästä kokeen lopussa). Esimerkki näytteenottoaikataulusta ja kalojen määrästä esitetään lisäyksessä 4.

Täyttö

Vesimäärän suhteessa kalojen määrään pitäisi olla sama kuin vesialtistuksessa (ks. 43 ja 44 kohta). Vaikka nopeus, jolla kaloja lisätään veteen, ei vaikuta altistuspitoisuuteen tässä testissä, kalaa on suositeltavaa lisätä 0,1–1,0 g (tuorepaino) vesilitraa kohti päivässä, jotta liuenneen hapen pitoisuus pysyy sopivana ja testiorganismiin kohdistuva stressi on mahdollisimman pieni.

Testiruokavalio ja ruokinta

Totuttamisvaiheessa kaloille annetaan sopivaa ravintoa edellä kuvatulla tavalla (117 kohta). Jos testi tehdään läpivirtausmenetelmällä, virtaus on keskeytettävä kalojen ruokinnan ajaksi.

Testin aikana testiryhmälle annettavassa ruokavaliossa on noudatettava edellä kuvattuja periaatteita (116–121 kohta). Ainekohtaisten tekijöiden, analyysin herkkyyden, luonnonympäristössä odotetun ruokavalioon kertymisen sekä kroonisen myrkyllisyyden/kertymisen lisäksi ruoan sisältämän testiaineen pitoisuuden valinnassa on huomioitava ruoan maittavuus (jotta kalat eivät jätä ruokaa syömättä). Testiraportissa on ilmoitettava testiaineen nimellispitoisuus ruoassa. Kokemuksen perusteella käytännön työn kannalta sopiva testiainepitoisuus ruoassa on 1–1 000 µg/g aineilla, joilla ei ole havaittavissa erityistä toksista mekanismia. Aineilla, joiden vaikutus ei perustu erityiseen mekanismiin, kudosjäämät eivät saa olla yli 5 µmol/g rasvaa, koska tätä suuremmat jäämät saattavat aiheuttaa kroonisia vaikutuksia (19) (48) (50) ([1]). Muiden aineiden osalta on huolehdittava siitä, ettei kumulatiivinen altistus aiheuta haittavaikutuksia (ks. 127 kohta). Tämä pätee erityisesti silloin, kun samanaikaisesti testataan useampaa kuin yhtä ainetta (ks. 112 kohta).

Sopiva määrä testiainetta voidaan lisätä kalanruokaan yhdellä kolmesta tavasta, jotka kuvataan 119 kohdassa ja lisäyksessä 7. Testiraportissa on ilmoitettava menetelmät ja menettelyt, joita on käytetty testiaineen lisäämiseksi rehuun. Vertailuryhmän kaloille annetaan käsittelemätöntä ruokaa, joka sisältää saman verran kantaja-aineena toimivaa öljyä (ilman testiainetta) kuin testiainetta sisältävä rehu, jos sitä on käytetty kertymävaiheessa, tai ruokaa, joka on käsitelty "puhtaalla" liuotinaineella, jos testiryhmän kaloille annetun ruoan valmistuksessa on käytetty kantaja-aineena liuotinta. Käsitelty ja käsittelemätön ruoka pitäisi analysoida sen sisältämän testiainepitoisuuden määrittämiseksi vähintään kolmeen otteeseen ennen kertymävaiheen alkamista ja sen päättyessä. Kun kalat on altistettu käsitellylle ruoalle (kertymävaihe), niille (kummankin ryhmän kaloille) annetaan käsittelemätöntä ruokaa (poistumavaihe).

Kaloille annetaan ruokaa tietty annos (jonka suuruus riippuu lajista; esimerkiksi kirjolohen päivittäinen ruoka-annos on noin 1–2 prosenttia kalan tuorepainosta). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Kokeen aikainen ruokkimistaajuus on kirjattava täsmällisesti ylös. Alkuvaiheen ruokinnassa pitäisi huomioida kantapopulaation suunniteltu punnitus, joka tehdään juuri ennen testin alkamista. Annettavan rehun määrää pitäisi mukauttaa kullakin näytteenottokerralla punnittujen kalojen tuorepainon mukaisesti, jotta voidaan huomioida kalojen kasvu kokeen aikana. Testi- ja vertailusäiliöissä olevien kalojen painot ja pituudet voidaan arvioida kulloinkin näytteeksi otettujen kalojen painojen ja kokonaispituuksien perusteella. Testi- ja vertailusäiliöihin jääviä kaloja ei punnita tai mitata. On tärkeää, että ruokkimistaajuus pidetään koko testin ajan samana.

([1]) Koska todellinen sisäinen pitoisuus voidaan määrittää vasta testin tekemisen jälkeen, on arvioitava odotettu sisäinen pitoisuus (esim. odotetun BMF-arvon ja ruoan sisältämän pitoisuuden perusteella; ks. liitteessä 5 esitetty yhtälö A5.8).

Ruokintaa pitäisi tarkkailla sen varmistamiseksi, että kalat syövät silmämääräisesti kaiken niille annetun ruoan. Näin voidaan taata, että laskennassa käytetään oikeita syöntimääriä. Ruokkimistaajuus pitäisi määrittää alustavien ruokintakokeiden tai aiemman kokemuksen perusteella, jotta kalat söisivät varmasti päivittäisen ruoka-annoksensa kokonaan. Jos kalat jättävät toistuvasti ruoan syömättä, ruoka kannattaa jakaa useampaan annokseen jokaisena testipäivänä (esimerkiksi puolittamalla päivittäinen annos ja antamalla se kahdesti päivässä yhden sijasta). Jos tämä katsotaan tarpeelliseksi, toinen ruokkimiskerta on järjestettävä aina samaan aikaan ja se on ajoitettava siten, että ennen näytteiden ottamista kuluu mahdollisimman pitkä aika (toinen ruokkimiskerta järjestetään esimerkiksi testivuorokauden ensimmäisen puoliskon aikana).

Vaikka kalat syövät ruoan yleensä nopeasti, on tärkeää varmistaa, että aine säilyy absorboituneena ruokaan. Testiaineen hajoaminen veteen pitäisi estää, jotta kalat eivät altistuisi testiainepitoisuudelle sekä veden että ruokavalion välityksellä. Tämä voidaan varmistaa siten, että syömättä jäänyt ruoka (ja ulosteet) poistetaan testi- ja vertailusäiliöistä viimeistään tunnin, mutta mieluiten puolen tunnin kuluessa ruokinnasta. Lisäksi voidaan käyttää aktiivihiilisuodatukseen perustuvaa järjestelmää, joka puhdistaa veden jatkuvasti absorboimalla veteen mahdollisesti liuenneet epäpuhtaudet. Läpivirtausjärjestelmien avulla ruokahiukkaset ja liuenneet aineet voidaan poistaa vedestä nopeasti ([1]). Joissakin tapauksissa tätä ongelmaa voidaan lievittää muuttamalla hieman testiainetta sisältävän ruoan valmistustekniikkaa (ks. 119 kohta).

Valo ja lämpötila

Samoin kuin vesialtistuksessa (ks. 48 kohta) valojakson pitäisi suositusten mukaan olla 12–16 tuntia ja lämpötila asetetaan testatuille lajeille sopivaksi (± 2 °C) (ks. lisäys 3). Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava ja kirjattava ylös.

Kontrollit

Kontrollia varten pitäisi olla yksi vertailuryhmä, jonka kaloille annetaan samaa rehua kuin testiryhmälle, mutta ilman testiainetta. Jos testiaine on lisätty testiryhmälle annettavaan rehuun käyttämällä kantaja-aineena öljyä tai liuotinta, vertailuryhmälle annettava ruoka on käsiteltävä muuten täysin samalla tavalla, mutta siihen ei lisätä testiainetta. Näin varmistetaan, että testi- ja vertailuryhmien ruokavaliot vastaavat toisiaan (ks. 121 ja 139 kohta).

Veden laatua koskevien mittausten taajuus

Tässäkin olosuhteet ovat samat kuin vesialtistuksessa lukuun ottamatta sitä, että TOC-arvo mitataan vain ennen testiä testiveden ominaisuuksia määritettäessä (ks. 53 kohta).

Näytteenotto ja kalojen ja ruoan analysointi

Ruokanäytteiden analysointi

Testi- ja vertailuryhmille annettavan ruoan testiaine- ja rasvapitoisuudet pitäisi analysoida vähintään kolmeen otteeseen ennen kertymävaiheen alkua ja sen päättyessä. Testiraportissa on ilmoitettava analyysimenetelmät sekä menettelyt, joilla on varmistettu ruoan homogeenisuus.

([1]) Testiainetta saattaa päästä väliaineeseen kalojen ulosteista tai sen uuttuessa ruoasta, mitä ei voida välttämättä täysin estää. Yksi vaihtoehto onkin mitata testiaineen pitoisuus vedessä kertymävaiheen lopussa, etenkin jos käytetään puolistaattista järjestelmää. Näin voidaan tarkistaa, ovatko kalat mahdollisesti altistuneet sille myös veden välityksellä.

Testiainepitoisuuden määrittämiseksi otetut näytteet pitäisi analysoida vakiintunutta ja validoitua menetelmää käyttäen. Tutkimusta edeltävä alustava testi on tarpeen kvantifiointirajan, prosenttimääräisen saannon, häiriötekijöiden sekä analyysia koskevan vaihtelun määrittämiseksi suunnitellusta näytematriisista. Radioaktiivista merkkiainetta testattaessa on otettava huomioon samat asiat kuin vesialtistuksessa, mutta veden sijasta analysoidaan rehu (ks. 65 kohta).

Kalanäytteiden analysointi

Kunakin näytteenottoajankohtana näytteeksi otetaan 5–10 kalaa altistus- ja vertailuryhmästä (joissakin tapauksissa pienempi määrä riittää; ks. 134 kohta).

Näytteet pitäisi ottaa kaikkina testipäivinä samaan aikaan (ruokkimisajankohdan mukaan), ja näytteenotto pitäisi myös ajoittaa siten, että todennäköisyys, että kalojen suolistossa on kertymävaiheessa ja poistumavaiheen alussa ruokaa, on mahdollisimman pieni. Tarkoituksena on välttää vääristymät testiaineen kokonaispitoisuudessa. (Näytteeksi otetut kalat on siten poistettava kunkin testivuorokauden päätteeksi ottaen huomioon, että testivuorokausi alkaa ruokintahetkestä ja päättyy seuraavaan ruokintaan, eli noin 24 tuntia myöhemmin. Poistumavaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa; ks. 128 kohta). Poistumavaiheen ensimmäinen näyte (joka otetaan vähän ennen kuin kaloille annetaan toisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa) on tärkeä, koska tätä mittausta käytetään edellisen päivän tuloksen ekstrapoloinnissa nolla-ajankohdan pitoisuuden arvioimiseksi ($C_{0,d}$, eli pitoisuus kalassa kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa). Vaihtoehtoisesti voidaan irrottaa kalan ruoansulatuskanava ja analysoida se erikseen kertymävaiheen alussa sekä poistumavaiheen ensimmäisenä ja kolmantena päivänä.

Kunakin näytteenottoajankohtana otetaan kaloja kummastakin testiastiasta, ja ne käsitellään samalla tavalla kuin vesialtistuksessa (ks. 61–63 kohta).

Testiainepitoisuus koko kalassa (tuorepainoon verrattuna) määritetään vähintään kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen aikana sekä vertailu- että testiryhmän kaloista. Poistumavaiheessa on suositeltavaa käyttää neljästä kuuteen näytteenottopistettä (esim. päivät 1, 3, 7, 14 ja 28). On myös mahdollista lisätä yksi näytteenottopiste kertymävaiheen kestettyä 1–3 vuorokautta, jotta voidaan arvioida assimilaatioteho kaloissa kertymävaiheen lineaarisessa osassa, kun altistusvaihe on vasta alussa. Aikataulusta voidaan poiketa pääasiassa kahdessa tapauksessa: i) jos kertymävaihetta pidennetään kertymäkinetiikan tutkimista varten, kertymävaiheessa otetaan yksi lisänäyte, jolloin on myös lisättävä näytteeksi otettavien kalojen määrää (ks. 126), tai ii) jos tutkimus on lopetettava kertymävaiheen jälkeen, koska kertymä on liian vähäinen mitattavaksi (ks. 131 kohta). Näytteeksi otetut kalat on punnittava yksitellen (ja niiden kokonaispituus mitattava), jotta voidaan määrittää kasvuvakio. Testiaineen pitoisuus tietyissä kalan kudoksissa (syötäväksi kelpaavissa ja kelpaamattomissa osissa) voidaan määrittää myös kertymävaiheen lopussa ja vapaavalintaisina ajankohtina poistumavaiheessa. Radioaktiivista merkkiainetta testattaessa on otettava huomioon samat asiat kuin vesialtistuksessa, mutta veden sijasta analysoidaan rehu (ks. 65 kohta).

Jos vertailuainetta käytetään jaksoittain (ks. 25 kohta), pitoisuudet on suositeltavaa mitata testiryhmästä (kokonaisista kaloista) kertymävaiheen lopussa sekä kaikkina kyseiselle testiaineelle määritettyinä ajankohtina poistumavaiheessa. Vertailuryhmässä pitoisuus analysoidaan (kokonaisista kaloista) vain kertymävaiheen lopussa. Tietyissä tilanteissa (jos esimerkiksi testiaineeseen ja vertailuaineeseen sovellettavat analyysitekniikat ovat keskenään epäsopivia, jolloin näytteenottoaikataulun noudattaminen edellyttäisi suurempaa määrää kaloja) voidaan soveltaa jotain muuta lähestymistapaa, jolla voidaan pitää tarvittavien lisäkalojen määrä mahdollisimman pienenä. Vertailuaineen pitoisuus mitataan poistumavaiheessa ainoastaan päivinä 1 ja 3 sekä kahdessa muussa näytteenottopisteessä, jotka valitaan siten, että niiden perusteella voidaan arvioida luotettavasti vertailuaineen pitoisuus nolla-ajankohtana ($C_{0,d}$) sekä k_2-arvo.

Yksittäisten kalojen rasvapitoisuus pitäisi määrittää mahdollisuuksien mukaan kaikkina näytteenottoajankohtina tai vähintään kertymävaiheen alussa ja lopussa sekä poistumavaiheen lopussa (ks. 56 ja 67 kohta). Analyysimenetelmästä riippuen (ks. 67 kohta ja lisäys 4) samaa kalaa voidaan mahdollisesti käyttää sekä rasvapitoisuuden että testiainepitoisuuden määrittämisessä. Tämä on suositeltavaa, jotta tarvittavien kalojen määrä pysyisi mahdollisimman pienenä. Jos tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, voidaan soveltaa samaa lähestymistapaa kuin vesialtistuksessa (ks. rasvapitoisuuden määrittämiseen sopivat vaihtoehtoiset keinot 56 kohdassa). Rasvapitoisuuden laskennassa käytetty menetelmä on ilmoitettava testiraportissa.

Analyysimenetelmän laatu

Kokeelliset tarkastukset ovat tarpeen, jotta voidaan varmistaa ainekohtaisen analyysitekniikan tarkkuus, oikeellisuus, täsmällisyys ja toistettavuus sekä taata testiaineen saanto ruoasta ja kaloista.

Kalojen kasvun mittaaminen

Testin alussa on punnittava osa kantapopulaation kaloista (ja mitattava niiden kokonaispituus). Kyseiset kalanäytteet pitäisi ottaa vähän (esim. tuntia) ennen kuin kaloille aletaan antaa testiainetta sisältävää ruokaa. Kyseessä on testipäivä 0. Tähän näytteeseen pitäisi ottaa saman verran kaloja kuin testin aikana otettaviin näytteisiin. Osa kaloista voi olla samoja kuin ne, joita käytetään rasvapitoisuuden analysoinnissa ennen kertymävaiheen alkua (ks. 153 kohta). Kullakin näytteenottokerralla kalat punnitaan ja niiden pituus mitataan ensin. Jokaisella näytteeksi otetulla kalalla mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn kemikaalipitoisuuteen (ja tarvittaessa myös rasvapitoisuuteen) esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta. Näytteiksi otettujen kalojen mittoja voidaan käyttää testi- ja kontrollisäiliöihin jäävien kalojen painon ja pituuden arvioinnissa.

Kokeellinen arviointi

Kuolleisuutta pitäisi tarkkailla ja se pitäisi kirjata muistiin päivittäin. Lisäksi pitäisi määrittää ja kirjata haittavaikutukset, kuten epätavallinen käytös tai pigmenttimuutokset. Kala katsotaan kuolleeksi, jos se ei hengitä eikä reagoi vähäiseen mekaaniseen ärsykkeeseen. Kuolleet tai selvästi kuolemaisillaan olevat kalat on poistettava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Tuloksia käytetään poistumavakion (k_2) määrittämisessä kalojen kokonaistuorepainon funktiona. Kasvuvakio (k_g) lasketaan kalojen painon keskimääräisen nousun perusteella, ja sitä käytetään tarvittaessa kasvukorjatun poistumavakion (k_{2g}) määrittämisessä. Lisäksi pitäisi ilmoittaa assimilaatioteho (a; absorboituminen suolistosta), kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_K) (tarvittaessa annetaan kasvukorjattu arvo, eli BMF_{Kg}), rasvapitoisuuden mukaan korjattu BMF-arvo (BMF_{KL} tai BMF_{KgL}, jos arvo on korjattu kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan) sekä ruokkimistaajuus. Jos kertymävaiheessa tasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika voidaan arvioida (esim. 95 prosenttia tasapainotilasta tai $t_{95} = 3{,}0/k_2$), voidaan ilmoittaa myös tasapainotilan arvioitu BMF (BMF_{SS}) (ks. 105 ja 106 kohta sekä lisäys 5) edellyttäen, että tasapainotila on t_{95}-arvon perusteella mahdollisesti saavutettu. BMF_{SS}-arvo korjataan rasvapitoisuuden mukaan käyttäen samaa menetelmää kuin kineettisesti johdetulla BMF:llä (BMF_K), jotta siitä voidaan ilmoittaa rasvapitoisuuden mukaan korjattu arvo BMF_{SSL} (huomaa, ettei tasapainotilan BMF:n korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan ole yleisesti hyväksyttyä menettelyä). Kaavoja ja laskentaesimerkkejä esitellään liitteessä 7. Käytettävissä on menetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ravintotutkimuksessa saatujen tietojen perusteella. Asiaa käsitellään liitteessä 8.

Tiedot kalojen painosta ja pituudesta

Eri ajankohtina saadut yksittäisten kalojen tuorepainot ja pituudet taulukoidaan erikseen testi- ja vertailuryhmittäin kertymävaiheen kaikilta näytteenottopäiviltä (kantapopulaation kaloista taulukoidaan kertymävaiheen alussa otetut mitat; vertailu- ja testiryhmien kaloista kertymävaiheen lopussa ja tarvittaessa kertymävaiheen alussa, esimerkiksi kertymävaiheen päivinä 1–3, sekä poistumavaiheessa esimerkiksi päivinä 1, 2, 4, 7, 14 ja 28, otetut mitat). Kasvua seurataan mieluiten painon perusteella kasvun aiheuttaman liukenemisen huomioon ottamiseksi. Tietojen korjaamisessa kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan sovellettava(t) menetelmä(t) esitellään jäljempänä (162 ja 163 kohta) sekä liitteessä 5.

Tiedot testiaineen pitoisuudesta kaloissa

Tiedot sekä testi- että vertailuryhmien yksittäisistä kaloista mitatuista testiaineen jäämistä (tai jos jäämiä ei voida mitata yksittäisistä kaloista, kalanäytteiden yhdistetyt tiedot) ilmoitetaan pitoisuutena suhteessa tuorepainoon ja taulukoidaan kultakin näytteenottoajankohdalta. Jos rasvapitoisuus on määritetty erikseen jokaisesta näytekalasta, voidaan johtaa ja taulukoida yksilökohtaiset rasvapitoisuuden mukaan korjatut pitoisuudet (rasvapitoisuus suhteessa tuorepainoon).

— Poistumavaiheessa yksittäisistä kaloista mitatut testiainejäämät (tai jos niitä ei voida mitata yksittäisistä kaloista, kalanäytteiden yhdistetyt jäämät, ks. 66 kohta) muunnetaan luonnollisiksi logaritmeiksi ja esitetään ajan funktiona (vuorokausi). Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

— Lineaarinen pienimmän neliösumman kerroin lasketaan suhteuttamalla ln(konsentraatio) eli lineaarinen konsentraatio poistuma-ajan (vuorokausi) tietoihin. Suoran kulmakerroin ja leikkauspiste ilmoitetaan yleisenä poistumavakiona (k_2) ja johdetun nolla-ajankohdan pitoisuuden luonnollisena logaritmina ($C_{0,d}$) (ks. lisätietoa liitteistä 5 ja 7). Jos tämä ei ole mahdollista, koska pitoisuudet jäävät poistumavaiheen toisessa näytteessä kvantifiointirajan alle, k_2 -arvo voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. lisäys 7).

— Suoran kulmakertoimen ja leikkauspisteen varianssit lasketaan soveltamalla standardeja tilastomenetelmiä sekä 90 prosentin (tai 95 prosentin) luottamusväliä arvioituihin ja esitettyihin tuloksiin.

— Lisäksi lasketaan kertymävaiheen viimeisenä päivänä kaloista mitattujen pitoisuuksien keskiarvo (mitattu nolla-ajankohdan pitoisuus $C_{0,m}$), jota verrataan johdettuun arvoon $C_{0,d}$. Jos johdettu arvo on pienempi kuin mitattu arvo, se saattaa olla merkki siitä, että kalojen suolistossa on sulamatonta ruokaa. Jos taas johdettu arvo on paljon suurempi kuin mitattu arvo, poistumakaudella saatujen tietojen lineaarisen regression perusteella johdettu arvo voi olla virheellinen ja se on arvioitava uudelleen (ks. lisäys 7).

Poistumavakio ja biomagnifikaatiokerroin

Biomagnifikaatiokertoimen laskeminen saatujen tietojen perusteella edellyttää, että ensin määritetään assimilaatioteho (testiaineen absorboituminen suolistossa, a). Tässä pitäisi soveltaa liitteessä 7 esitettyä yhtälöä A7.1, jota varten tiedossa on oltava johdettu pitoisuus kalassa poistumavaiheen nolla-ajankohtana ($C_{0,d}$), (yleinen) poistumavakio (k_2), pitoisuus ruoassa (C_{ruoka}), ruoan imeytymisvakio (I) ja kertymävaiheen kesto (t). Ln (konsentraation) ja poistuma-ajan välisen lineaarisen suhteen kulmakerroin ja leikkauspiste ilmoitetaan yleisenä poistumavakiona (k_2 = kulmakerroin) ja nolla-ajankohdan pitoisuutena ($C_{0,d} = e^{intercept}$), kuten edellä esitetään. Johdettujen arvojen biologinen paikkansapitävyys pitäisi tarkistaa (assimilaatiotehon osuus ei esimerkiksi voi olla suurempi kuin 1). (I) lasketaan jakamalla ruoan massa päivittäin ruokittujen kalojen massalla (jos ruoan määrä on 2 prosenttia ruumiinpainosta, I on 0,02). Laskennassa sovellettavaa ruokkimistaajuutta saatetaan kuitenkin joutua muuttamaan kalojen kasvun mukaisesti (mikä voidaan tehdä käyttämällä tiedossa olevaa kasvuvakiota kalojen painon arvioimiseksi kunakin kertymävaiheen ajankohtana; ks. lisäys 7). Jos k_2- ja $C_{0,d}$-arvoja ei voida johtaa esimerkiksi sen takia, että pitoisuudet laskevat alle havaitsemisrajan poistumavaiheen toiseen näytteenottokertaan mennessä, k_2-arvo ja BMF_k-arvon yläraja voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. lisäys 7).

Kun assimilaatioteho (a) on saavutettu, biomagnifikaatiokerroin voidaan laskea kertomalla a ruoan imeytymisvakiolla (I) ja jakamalla tulo (yleisellä) poistumavakiolla (k_2). Kasvukorjattu biomagnifikaatiokerroin lasketaan muuten samalla tavalla, mutta laskennassa käytetään kasvukorjattua poistumavakiota (k_{2g}; ks. 162 ja 163 kohta). Assimilaatioteholle voidaan myös johtaa vaihtoehtoinen arvio, jos kertymävaiheen alkupuolella lineaarisessa vaiheessa näytteeksi otetuille kaloille on tehty kudosanalyysi (ks. 151 kohta ja lisäys 7). Kyseessä on riippumaton arvio assimilaatiotehosta pääasiassa altistamattomissa organismeissa (eli kalat ovat juuri aloittamassa kertymävaiheen). Poistumatietojen perusteella arvioitua assimilaatiotehoa käytetään tavallisesti BMF:n johtamisessa.

Korjaaminen rasvapitoisuuden ja kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan

Poistumavaiheessa tapahtuva kasvu voi alentaa kaloissa mitattua kemikaalipitoisuutta, minkä johdosta yleinen poistumavakio k_2 on suurempi kuin pelkkien poistoprosessien (esim. metabolismi ja ulostaminen) seurauksena syntyvä vakio (ks. 72 kohta). Testikalojen rasvapitoisuus (joka on selvästi sidoksissa hydrofobisten aineiden bioakkumulaatioon) sekä ruoan rasvapitoisuus voivat käytännössä vaihdella sen verran, että niitä on korjattava, jotta biomagnifikaatiokertoimet voidaan esittää tarkoituksenmukaisesti. Biomagnifikaatiokerroin pitäisi korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan (kuten kineettinen BCF vesialtistuksessa) sekä ruoan rasvapitoisuuden mukaan suhteessa kalan rasvapitoisuuteen (rasvapitoisuuden korjauskerroin). Näitä laskutoimituksia koskevia yhtälöitä esitellään liitteessä 5 ja esimerkkejä liitteessä 7.

Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävää korjausta varten on laskettava kasvukorjattu poistumavakio k_{2g} (ks. yhtälöt liitteessä 5). Kasvukorjattua poistumavakiota (k_{2g}) käytetään kasvukorjatun biomagnifikaatiokertoimen laskennassa, kuten esitetään 73 kohdassa. Joissakin tapauksissa tämä lähestymistapa ei ole mahdollinen. On olemassa vaihtoehtoinen lähestymistapa, joka ei edellytä korjaamista kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Siinä käytetään testiaineen massaa koskevia poistumatietoja kalakohtaisesti (kokonainen kala perusteena) sen sijaan, että testiaineen massaa koskevat tiedot suhteutettaisiin kalan massayksikköä (pitoisuutta) koskeviin tietoihin. Tämä voidaan tehdä helposti, koska kyseisessä testimenetelmässä kudoksissa havaitut pitoisuudet pitää liittää yksittäisten kalojen painoon. Tätä koskevaa yksinkertaista menettelyä kuvataan liitteessä 5. On huomattava, että k_2 pitää arvioida ja raportoida myös vaihtoehtoista lähestymistapaa sovellettaessa.

Jos kaikista näytteeksi otetuista kaloista ei ole analysoitu rasvapitoisuutta, ruoan ja kalan rasvapitoisuuden mukainen korjaaminen edellyttää, että sekä kaloille että ruoalle johdetaan keskimääräiset rasvaosuudet (tuorepainoon verrattuna) ([1]). Rasvapitoisuuden korjauskerroin (L_c) lasketaan tämän jälkeen jakamalla kalan keskimääräinen rasvaosuus ruoan keskimääräisellä rasvaosuudella. Biomagnifikaatiokerroin, tarvittaessa kasvukorjattuna, jaetaan rasvapitoisuuden korjauskertoimella rasvapitoisuuden mukaan korjatun biomagnifikaation laskemiseksi.

Jos kemikaali- ja rasvapitoisuudet on analysoitu kaikissa näytteenottopisteissä samoista kaloista, yksittäisten kalojen kudoksista saatuja ja rasvapitoisuuden mukaan korjattuja tietoja voidaan käyttää suoraan rasvapitoisuuden mukaan korjatun BMF:n laskennassa (ks. 37 kohta). Rasvapitoisuuden mukaan korjatun pitoisuuskäyrän tiedot osoittavat rasvapitoisuuteen perustuvan $C_{0,d}$-arvon sekä k_2-arvon. Tämän jälkeen voidaan tehdä matemaattinen analyysi käyttäen liitteessä 7 esitettyjä yhtälöitä, mutta assimilaatioteho (a) lasketaan käyttäen rasvapitoisuuden mukaan normalisoitua ruoan imeytymisvakiota (I_{rasva}) ja rasvapitoisuuteen perustuvaa pitoisuutta ruokavaliossa ($C_{ruoka\text{-}rasva}$). Rasvapitoisuuden mukaan korjattuja muuttujia käytetään samalla tavalla BMF:n laskemisessa (huomaa, että rasvaosuuteen pitäisi myös soveltaa mieluummin korjattua kasvuvakiota kuin kalan tuorepainoa rasvapitoisuuden ja kasvun mukaan korjatun BMF_{KgL}-arvon laskemiseksi).

Tulosten tulkinta

Testi- ja vertailuryhmien kalojen keskimääräinen kasvu ei saisi periaatteessa erota merkittävästi, jotta voidaan sulkea pois toksisuus. Kummankin ryhmän kasvuvakioita tai kasvukäyriä pitäisi verrata tarkoitukseen sopivalla menetelmällä ([2])).

Testiraportti

Tutkimuksen päätyttyä laaditaan loppuseloste, joka sisältää tiedot *testiaineesta*, *testatuista lajeista* sekä *testiolosuhteista*, kuten mainitaan 81 kohdassa (samat tiedot kuin vesialtistuksessa). Lisäksi on ilmoitettava seuraavat tiedot:

([1]) Tämä lähestymistapa koskee vain ravinnon välityksellä tehtävää tutkimusta, joten menettely on erilainen kuin vesialtistuksessa. Sekaannusten välttämiseksi käytetään siksi ”normalisoinnin” sijasta mieluummin käsitettä ”korjaaminen”. Ks. myös alaviite kappaleessa 106.

([2]) Kasvuvakioita koskeva *t*-testi voidaan tehdä sen määrittämiseksi, onko vertailu- ja testiryhmien kalojen kasvussa eroja. Vaihtelu voidaan analysoida *F*-testillä. *F*-testiä tai uskottavuusosamäärätestiä voidaan tarvittaessa käyttää apuna sopivan kasvumallin valinnassa (OECD monograph 54, (32).

Testiaine:

— Kaikki tiedot testiaineen stabiiliudesta käsitellyssä ruoassa.

Testiolosuhteet:

— Aineen nimellinen pitoisuus ruoassa, testiaineen lisäämisessä käytetty tekniikka, testiaineen lisäämisessä käytetyn kantaja-aineen (rasvan) määrä (tarvittaessa), testiainetta sisältävässä ruoassa olevaa testiaineen pitoisuutta koskevat mittaustiedot kultakin analysointikerralta (tiedot mitataan vähintään kolmeen otteeseen ennen tutkimuksen alkamista sekä kertymävaiheen lopussa) sekä keskimääräiset arvot.

— Jos testiaineen lisäämisessä ruokaan on käytetty kantaja-aineena öljyä tai liuotinta, sen tyyppi ja laatu (laatuluokka, toimittaja ja niin edelleen).

— Käytetyn ruoan tyyppi (suuntaa-antava analyysi ([1]), laatuluokka tai toimittaja ja niin edelleen), ruokkimistaajuus kertymävaiheessa, annetun ruoan määrä ja ruokkimistiheys (sekä tiedot niihin näytekalojen painon perusteella mahdollisesti tehdyistä muutoksista).

— Ajankohta, jona kalat kerättiin ja tainnutettiin kemikaalien analysointia varten kussakin näytteenottopisteessä (esim. tuntia ennen seuraavan päivän ruokintaa).

Tulokset:

— Mahdollisista esikokeista saadut tulokset.

— Tiedot mahdollisista havaituista haittavaikutuksista.

— Kattava kuvaus kaikista kemikaalien analysoinnissa käytetyistä menettelyistä havaitsemis- ja kvantifiointirajat, vaihtelu ja saanto mukaan luettuina.

— Ruoassa (sekä testiainetta sisältävä että vertailuruokavalio) mitatut rasvapitoisuudet, keskiarvot ja standardit poikkeamat.

— Taulukoidut tiedot kalojen painosta (ja pituudesta) liitettyinä yksittäisten kalojen tietoihin sekä vertailu- että altistusryhmässä (esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilökohtaista tunnistetta) sekä niitä koskevat laskutoimitukset, johdettu kasvuvakio (tai johdetut kasvuvakiot) ja 95 prosentin luottamusväli(t).

— Taulukoidut tiedot kaloissa todetusta testiainepitoisuudesta, mitattujen pitoisuuksien keskiarvo kertymävaiheen lopussa ($C_{0,m}$), johdettu (yleinen) poistumavakio (k_2), pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alussa ($C_{0,d}$) sekä mainituissa arvoissa esiintyvä vaihtelu (kulmakerroin ja leikkauspiste).

— Taulukoidut tiedot kalojen rasvapitoisuudesta (lueteltuina suhteessa tiettyjen aineiden pitoisuuksiin, jos mahdollista) sekä testi- ja vertailuryhmän keskiarvot testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa.

— Käyrät (kaikki mittaustiedot mukaan luettuina), jotka osoittavat seuraavat seikat (tarvittaessa pitoisuudet voidaan ilmaista suhteessa kalan kokonaispainoon tai tiettyihin kudoksiin):

  — kasvu (eli kalan painon ja pituuden kehitys tiettynä aikana) tai luonnollisen logaritmin mukaan muunnettu paino aikaan suhteutettuna

  — testiaineen poistuma kaloista

  — luonnollisen logaritmin mukaan muunnettu pitoisuus (lineaarinen pitoisuus) suhteessa poistuma-aikaan (mukaan luettuina johdettu poistumavakio k_2 sekä luonnollisen logaritmin mukaan johdettu pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alkaessa, $C_{0,d}$).

— Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

([1]) Elintarvikkeiden sisältämän proteiinin, rasvan, raakakuidun ja tuhkan analyysitekniikka. Tämän tiedon saa tavallisesti rehun toimittajalta.

— Laskettu ja kasvukorjattu poistumavakio ja kasvukorjattu puoliintumisaika.

— Laskettu assimilaatioteho (α).

— ”Suoraan saatu” ravintoon liittyvä BMF, rasvapitoisuuden ja kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan korjattu kineettinen BMF (”suoraan saatu” ja rasvapitoisuuden mukaan korjattu suhteessa kokonaisen kalan tuorepainoon sekä kudoskohtainen BMF, jos se on tiedossa).

— Mahdolliset tiedot radioaktiivisten merkkiaineiden metaboliiteista ja niiden kertymisestä.

— Mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

— Yhteenvetotaulukko merkityksellisistä määritetyistä ja laskennallisista tiedoista seuraavasti:

Aineen poistumavakiot ja biomagnifikaatiokertoimet (BMF_K)	
k_g (kasvuvakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_2 (yleinen poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI)
k_{2g} (kasvukorjattu poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
$C_{0,m}$ (nolla-ajankohtana mitattu pitoisuus, pitoisuus kaloissa kertymävaiheen lopussa) (µg/g):	Lisää arvo ± SD (2)
$C_{0,d}$ (poistumavaiheen nolla-ajankohtana johdettu pitoisuus; µg/g):	Lisää arvo ± SD (2)
I (määritetty rehun imeytymisvakio; g ruokaa / g kalaa / vrk):	Lisää arvo
I_g (todellinen ruokkimistaajuus kasvun mukaan mukautettuna; g ruokaa / g kalaa / vrk) (2):	Lisää arvo ± SD (2)
C_{ruoka} (kemikaalipitoisuus ruoassa; µg/g):	Lisää arvo ± SD (2)
α (aineen assimilaatioteho):	Lisää arvo ± SD (2)
BMF_K (ravintoon liittyvä kineettinen BMF):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
BMF_{Kg} (ravintoon liittyvä kasvukorjattu kineettinen BMF):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
$t_{1/2g}$ (kasvukorjattu puoliintumisaika vuorokausina):	Lisää arvo ± SD (2)
Lc (rasvapitoisuuden korjauskerroin):	Lisää arvo
BMF_{KgL} (rasvapitoisuuden ja kasvun mukaan korjattu kineettinen BMF):	Lisää arvo
$BMF_{SS\text{-}L}$ (suuntaa-antava rasvapitoisuuden mukaan korjattu tasapainotilan BMF) (2):	Lisää arvo ± SD (2)

(1) CI, Confidence interval: luottamusväli (kun mahdollista arvioida).
(2) SD, Standard deviation: standardipoikkeama (kun mahdollista arvioida).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tässä liitteessä oleva C.13 luku, *Biokertyvyys: läpivirtaustesti kaloilla*.

(2) Tässä liitteessä oleva A.6 luku, *Vesiliukoisuus*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031–2035

(4) Tässä liitteessä oleva A.8 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi): Ravistuspullomenetelmä.

(5) *Tässä liitteessä oleva A.24 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi), korkean suorituskyvyn nestekromatografia (hplc-menetelmä).*

(6) *Tässä liitteessä oleva A.23 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi), hitaan sekoituksen menetelmä.*

(7) *Tässä liitteessä oleva C.7 luku, Hydrolyysi pH:n funktiona.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) *Tässä liitteessä oleva A.5 luku, Pintajännitys.*

(10) *Tässä liitteessä oleva A.4 luku, Höyrynpaine.*

(11) *Tässä liitteessä oleva C.4 luku, Biohajoavuuden määritys.*

(12) *Tässä liitteessä oleva C.29 luku, Biohajoavuus – CO_2 suljetuissa astioissa*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117–156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29–39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097–4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058–2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206–218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139–155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436–2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Tässä liitteessä oleva C.47 luku, Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheessa.

(23) Tässä liitteessä oleva C.15 luku, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

(24) Tässä liitteessä oleva C.14 luku, Fish, Juvenile Growth Test.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099–1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711–1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO (2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168–1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775–1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173–189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829–833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699–707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219–229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769–2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951–961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503–2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718–1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Altistus- eli kertymävaihe tarkoittaa ajanjaksoa, jona kalat altistetaan testiaineelle.

Assimilaatioteholla (α) mitataan suolistosta organismiin absorboituvan aineen suhteellista määrää (assimilaatioteholla ei ole yksikköä, mutta se ilmaistaan usein mieluummin prosentteina kuin fraktiona).

Bioakkumulaatiolla tarkoitetaan tavallisesti prosessia, jonka aikana aineen pitoisuus organismissa ylittää hengityksen mahdollistavassa elementissä (esim. kaloilla vedessä ja nisäkkäillä ilmassa), ruoassa tai kummassakin vallitsevan tason(1).

Biokertyvyys (biokonsentraatio) on organismissa tai sen pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa tai kudoksen pinnalla) olevan testiainepitoisuuden lisääntymistä, joka liittyy testiaineen pitoisuuteen väliaineessa.

Biokertyvyystekijä (bioconcentration factor BCF tai K_B) osoittaa minä tahansa tämän akkumulaatiotestin kertymävaiheen ajankohtana testiaineen pitoisuuden kalassa (kalan pinnalla) tai tietyssä kalan kudoksessa (C_f, mg/kg) jaettuna kyseisen aineen pitoisuudella väliaineessa (C_w, mg/l). BCF:n yksikkö on l kg^{-1}. Huomaa, että kasvun ja/tai standardin rasvapitoisuuden mukaan tehtyjä korjauksia ei oteta huomioon.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa tai kudoksen pinnalla) olevan testiainepitoisuuden lisääntymistä, joka liittyy testiaineen pitoisuuteen ruoassa.

Biomagnifikaatiokerroin (BMF) ilmaisee aineen pitoisuuden petokalassa suhteessa petokalan saaliiseen (tai ruokaan) tasapainotilassa. Tässä osiossa kuvatussa menetelmässä vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksissa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Kemikaali on aine tai seos.

Kertymävakio (k_1) on numeerinen arvo, joka määrittelee testiaineen pitoisuuden lisääntymisen nopeuden kaloissa tai kalojen pinnalla (tai niiden tietyissä kudoksissa), kun kalat altistetaan kyseiselle aineelle (k_1:n yksikkö on l kg^{-1} vuorokausi-).

Kiinteäfaasiuutto (SPME) on laimennusjärjestelmiä varten kehitetty analyysitekniikka, jossa ei käytetä liuotinaineita. Tässä menetelmässä polymeereillä valeltu kuitu altistetaan kaasu- tai nestefaasille, joka sisältää kiinnostuksen kohteena olevaa analyyttia. Yleensä analyysille määritetään vähimmäiskesto, jotta kiinteän ja nestemäisen vaiheen välille voidaan määrittää tasapainotila määrityksen kohteena olevasta lajista riippuen. Kiinnostuksen kohteena olevan analyytin pitoisuus voidaan tämän jälkeen tekniikasta riippuen määrittää joko suoraan kuidusta tai kun se on uutettu kuidusta liuotinaineeseen.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ilmaisee kertymävakion k_1 suhteessa poistumavakioon k_2 (k_1/k_2; ks. tässä liitteessä annetut määritelmät). Tämän arvon pitäisi periaatteessa olla verrattavissa BCF_{SS}-arvoon (ks. määritelmä edellä), mutta poikkeamia saattaa esiintyä, jos tasapainotilan saavuttamisesta ei ole varmuutta tai kineettistä BCF:ää on korjattu kasvun mukaan.

Liuennut orgaaninen hiili (DOC) on mitta, joka ilmaisee liuenneista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa.

Lyhenne UCVB tarkoittaa koostumukseltaan tuntemattomia tai vaihtelevia aineita, kompleksien reaktiotuotteita tai biologista materiaalia (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials).

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (K_{OW}) on aineen n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa (menetelmät A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)), josta käytetään myös merkintää P_{OW}. K_{OW}:n logaritmia käytetään merkitsemään aineen biokertyvyyttä vesieliöissä.

Orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC) on mitta, joka ilmaisee kaikista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa partikkelimuodossa olevat ja liuenneet lähteet mukaan luettuina.

Partikkelimuodossa oleva orgaaninen hiili (POC) on mitta, joka ilmaisee suspendoituneista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa.

Poistumavaihe tai altistuksen jälkeinen vaihe on ajanjakso, joka alkaa, kun testattavat kalat on siirretty testiainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta, ja jonka aikana tutkitaan kyseisen aineen (netto)poistumaa testattavista kaloista (tai niiden tietyistä kudoksista).

Poistumavakio (k_2) on numeerinen arvo, joka kuvaa testiaineen pitoisuuden alenemisen nopeutta kaloissa (tai niiden tietyssä kudoksessa), kun kalat on siirretty testiainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta (k_2:n yksikkö on vuorokausi^{-1}).

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kasvukorjattu kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_{KgI}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaan ja korjataan kasvun perusteella tutkimuksen aikana, kuten kuvataan liitteessä 5.

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_{KI}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SSL}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

Ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin: Tässä testimenetelmässä käytetään ilmaisua ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (ravintoon liittyvä BMF) kuvattaessa ravinnon välityksellä tapahtuvaa altistusta, jossa vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa ruoan BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksissa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Ruoan imeytymisvakio (I) tarkoittaa kunkin kalan päivittäin syömän ruoan keskiarvoa suhteessa kokonaisen kalan arvioituun ruumiinpainoon (yksikkönä g ruokaa / g kalaa / vuorokausi).

Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testiaineen määrää (Ct) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä Ct-määritystä ovat samat ± 20 prosenttia eikä Ct ole kasvanut merkittävästi ensimmäisen ja viimeisen perättäisen määrityksen välisenä aikana. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä perättäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta.

Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}) ei muutu merkittävästi pitkällä aikavälillä, kun testiaineen pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (ks. tasapainotilan määritelmä).

Testikemikaali on mikä tahansa tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Useista ainesosista koostuvat aineet määritellään REACH-asetuksessa aineiksi, jotka koostuvat useammasta kuin yhdestä sellaisesta pääainesosasta, jonka pitoisuus on 10–80 prosenttia (tuorepainosta).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments, Integr. Environ. Assess. Manag. 5: s. 624–637

(2) Tässä liitteessä oleva A.8 luku: *Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi) – ravistuspullomenetelmä.*

(3) Tässä liitteessä oleva A.24 luku: *Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi) – HPLC-menetelmä.*

(4) Tässä liitteessä oleva A.23 luku: *Jakaantumiskerroin (1-oktanoli/vesi) – hidassekoitusmenetelmä.*

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Ainesosa	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

Lisäys 3

KALALAJIT, JOITA SUOSITELLAAN KÄYTETTÄVÄKSI TESTISSÄ

Suositeltu laji	Suositeltu lämpötilaväli (°C)	Suositeltu koe-eläimen kokonaispituus (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Seeprakala	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Paksupäämutu	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karppi	20–25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck ja Schlegel) Medaka	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poecilliidae) (Peters) engl. Guppy	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Isoaurinkoahven	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Kirjolohi	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Kolmipiikki	18–20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)
(2) Olisi otettava huomion, että itse testissä pidetään painoa parempana yksikkönä koon mittaamisessa ja kasvuvakion johtamisessa. Yleisesti kuitenkin tunnustetaan, että pituus on käytännöllisempi mittari, jos kalat on valittava kokeen alussa silmämääräisesti (kantapopulaatiosta).
(3) Tämä pituuden vaihteluväli määritetään Japanin kemikaalivalvontalakiin perustuvissa uusia kemikaaleja jne. koskevissa testimenetelmissä.

Erilaisia suisto- ja merikalalajeja on käytetty vähemmän. Esimerkkejä:

Puoliraitarummuttaja (*Leiostomus xanthurus*)

Loistohammaskarppi (*Cyprinodon variegatus*)

Hopeakylki (*Menidia beryllina*)

Shiner perch *(engl.)* (*Cymatogaster aggregata*)

Kielikampela (*Parophrys vetulus*)

Simppu (*Leptocottus armatus*)

Kolmipiikki (*Gasterosteus aculeatus*)

Meribassi (*Dicentracus labrax*)

Salakka (*Alburnus alburnus*)

Edellä olevassa taulukossa lueteltuja makean veden kaloja on helppo kasvattaa ja/tai niitä on helposti saatavissa läpi vuoden, kun taas meri- tai suistokalalajeja on lähinnä saatavissa tiettyjä meriä ja suistoja ympäröivissä maissa. Niitä voidaan kasvattaa joko kalanviljelylaitoksissa tai laboratorioissa, joissa voidaan torjua tauteja ja loisia niin, että saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden alku/sukuperä tunnetaan. Näitä kaloja on saatavissa eri puolilla maailmaa.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231–236.

Lisäys 4

NÄYTTEENOTTOAIKATAULUT VEDEN JA RAVINNON VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVISSÄ ALTISTUSTESTEISSÄ

1. **Teoreettinen esimerkki näytteenottoaikataulusta kattavassa vesialtistukseen perustuvassa biokertyvyystestissä aineilla, joiden log K_{ow} = 4.**

Kalanäytteiden otto	Näytteenottoaikataulu		Vesinäytteiden lukumäärä (1)	Kalojen lukumäärä näytettä kohti (1)
	Vaadittu vähimmäistaajuus (vrk) (2)	Lisänäytteiden otto (vrk) (2)		
Kertymävaihe				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Poistumavaihe				Kalojen siirto veteen, jossa ei ole testiainetta
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Kalanäytteiden otto	Näytteenottoaikataulu		Vesinäytteiden lukumäärä (1)	Kalojen lukumäärä näytettä kohti (1)
	Vaadittu vähimmäistaajuus (vrk) (2)	Lisänäytteiden otto (vrk) (2)		
Kertymävaihe				
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
YHTEENSÄ				40–72 (48 – 80) (5)

(1) Suluissa olevat luvut osoittavat mahdollisten lisänäytteiden (vesi/kala) määrän.
(2) Ennen testiä tehty arvio k_2-arvosta, kun log K_{OW} 4,0 on 0,652 vrk^{-1}. Koko kokeen kesto on 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 vrk, eli 14 vuorokautta. T_{SS}-arvon arviointia varten katso lisäys 5.
(3) Vedestä otetaan näyte, kun kammioon on lisätty vähintään 3 kammion tilavuutta vettä.
(4) Nämä kalat valitaan näytettä varten kantapopulaatiosta.
(5) Jos testin on oltava tarkempi tai on tutkittava metaboloituminen, jolloin tarvitaan enemmän kaloja, näytekalat on valittava kertymävaiheen ja poistumavaiheen lopussa (ks. 40 kohta).
(6) Rasvapitoisuuden analysointiin saatetaan tarvitaan vähintään kolme kalaa enemmän, jos samoja kaloja ei voida käyttää ainepitoisuuden määrittämiseen testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa. Huomaa, että monissa tapauksissa kolme vertailuryhmän kalaa saattaa riittää (ks. 56 kohta).

2. **Teoreettinen esimerkki näytteenottoaikataulusta testattaessa aineen bioakkumulaatiota ravinnon välityksellä, kun kertymävaihe kestää 10 vuorokautta ja poistumavaihe 42 vuorokautta.**

Näytteenotto	Näytteenottoaikataulu		Ravintonäytteiden määrä	Kalojen määrä näytettä kohti	
	Päivä ko. vaiheessa	Ylimääräisten kalanäytteiden tarve		Testiryhmä	Vertailuryhmä
Kertymävaihe					
1	0	Mahdollinen (1) (2)	3 – testiryhmä	0	5–10
			3 – vertailuryhmä (1)		(8–13) (2)
1A (3)	1–3			5–10	5–10
2	10	Kyllä (4)	3 – testiryhmä	10–15 (4)	5–10
			3 – vertailuryhmä (1)	(13–18) (5)	(8–13) (5)
Poistumavaihe					
3	1	Kyllä (4)		10–15 (4)	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10

Näytteenotto	Näytteenottoaikataulu		Ravintonäytteiden määrä	Kalojen määrä näytettä kohti	
	Päivä ko. vaiheessa	Ylimääräisten kalanäytteiden tarve		Testiryhmä	Vertailuryhmä
Kertymävaihe					
6	7	Kyllä (4)		10–15 (4)	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Kyllä (4)		10–15 (4) (13–18) (5)	5–10 (8–13) (5)
YHTEENSÄ				59–120 (63–126) (4) (5)	50–110 (56–116) (4) (5)

(1) Vertailu- ja testiryhmässä otetaan kummassakin kolme rehunäytettä, joista analysoidaan testiaine- ja rasvapitoisuudet.
(2) Näytteeksi otettava kalat valitaan kantapopulaatiosta mahdollisimman lähellä testin alkamista. Kantapopulaatiosta valitaan vähintään kolme kalaa, joista mitataan rasvapitoisuus.
(3) Kertymävaiheen alussa voidaan (valinnaisesti) ottaa näyte, josta lasketaan testiaineen assimiloituminen ravinnon kautta, ja näitä tuloksia verrataan poistumavaiheen tietojen perusteella laskettuun assimilaatiotehoon.
(4) Kudoskohtaista analyysia varten voidaan ottaa näytteeksi viisi ylimääräistä kalaa.
(5) Rasvapitoisuuden analysointiin saatetaan tarvitaan vähintään kolme kalaa enemmän, jos samoja kaloja ei voida käyttää ainepitoisuuden määrittämiseen testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa. Huomaa, että monissa tapauksissa kolme vertailuryhmän kalaa saattaa riittää (ks. 56 ja 153 kohta).

Huomioita eri vaiheita ja näytteenottoa koskevista aikatauluista: Kertymävaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Testivuorokausi alkaa ruokinnasta ja päättyy juuri ennen seuraavaa ruokintaa 24 tuntia myöhemmin. Ensimmäinen näyte (nro 1 taulukossa) pitäisi ottaa juuri ennen (esimerkiksi tuntia ennen) ensimmäistä ruokintaa. Tutkimuksen aikana näyte otetaan mieluiten juuri ennen seuraavan päivän ruokintaa (eli noin 23 tuntia edellisen näytepäivän ruokinnan jälkeen). Kertymävaihe päättyy juuri ennen hetkeä, jona kaloille annetaan ensimmäistä kertaa ruokaa, joka ei sisällä testiainetta, ja jolloin poistumavaihe alkaa (testiainetta saattaa olla testiryhmän kalojen ruoansulatusjärjestelmässä 24 tunnin ajan sen jälkeen, kun niille on annettu viimeisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa). Näin ollen kertymävaiheen viimeinen näyte pitäisi ottaa juuri ennen kuin kaloille annetaan ruokaa, joka ei sisällä testiainetta, ja poistumavaiheen ensimmäinen näyte noin 23 tuntia tämän jälkeen.

Lisäys 5

YLEISET LASKUTOIMITUKSET

1. Johdanto

2. Kertymävaiheen keston arvioiminen

3. Poistumavaiheen keston arvioiminen

4. Vaiheittainen menetelmä: poistumavakion k2 määrittäminen

5. Vaiheittainen menetelmä: kertymävakion k1 määrittäminen (vain veden välityksellä tehtävässä altistuksessa)

6. Kertymä- ja poistumavakioiden laskennassa sovellettava samanaikaismenetelmä (vain veden välityksellä tehtävä altistus)

7. Kineettisen BCF:n ja BMF:n korjaaminen kasvun mukaan

8. Rasvapitoisuuden normalisointi viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (koskee ainoastaan vesialtistusmenetelmää)

1. JOHDANTO

Veden välityksellä tapahtuvan biokertyvyyden yleinen malli voidaan kuvata kaloilla kertymä- ja poistumaprosesseina ruoan kautta tapahtuvasta kertymästä välittämättä. Kaloissa olevien pitoisuuksien ($mg \cdot kg^{-1} \cdot vrk^{-1}$) muutosvakiota koskeva erotuskaavio (dC_f/dt) saadaan seuraavasti (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.1]}$$

Tässä yhtälössä:

k_1 = ensimmäisen asteen kertymävakio kaloissa ($l \cdot kg^{-1} \cdot vrk^{-1}$).

k_2 = ensimmäisen asteen poistumavakio kaloista (vrk^{-1}).

k_g = ensimmäisen asteen kasvuvakio kaloilla (”kasvun aiheuttama liukeneminen”) (vrk^{-1})

k_m = ensimmäisen asteen metabolinen vaikutus (vrk^{-1})

k_e = ensimmäisen asteen uloste-eritys (vrk^{-1})

C_w = pitoisuus vedessä ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = pitoisuus kaloissa ($mg \cdot kg^{-1}$ tuorepainosta).

Biokertyvillä aineilla on odotettavissa, että aikapainotettu keskiarvo osoittaa parhaiten hyväksyttävän vaihteluvälin rajoissa olevan altistuspitoisuuden vedessä (C_w) (ks. 24 kohta). Pitoisuuksien aikapainotettu keskiarvo (TWA) vedessä on suositeltavaa laskea testimenetelmän C.20 liitteessä 6 esitettyä menettelyä noudattaen (2). On huomattava, että vesipitoisuuden lineaarinen muutos on sopiva, kun uusiutumiskausien välissä on odotettavissa eksponentiaalista hajoamista, kuten puolistaattisessa testijärjestelmässä. Läpivirtausjärjestelmässä altistuspitoisuuksien lineaarinen muutos ei välttämättä ole tarpeellinen. Jos aikapainotetut keskiarvot vedessä on johdettu, ne on ilmoitettava ja niitä on käytettävä myöhemmissä laskelmissa.

Standardissa kaloilla tehtävässä BCF-testissä kertymä ja poistuma voidaan kuvata kahden ensimmäisen asteen kineettisen prosessin mukaisesti.

$$ertymä = k_1 \times C_w \qquad \text{[Yhtälö A5.2]}$$

$$kokonaispoistuma = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.3]}$$

Tasapainotilassa kasvun ja metaboloitumisen arvioinnilla ei ole merkitystä (k_g- ja k_m-arvoja ei voida erottaa nollasta) ja kertymävakio vastaa poistumavakiota, joten yhtälöt A5.2 ja A5.3 osoittavat yhdistettyinä seuraavan suhteen:

$$BCF = \frac{C_{f-ss}}{C_{w-ss}} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A5.4]}$$

Tässä:

$C_{f\text{-}SS}$ = pitoisuus kaloissa tasapainotilassa (mg kg^{-1} tuorepaino).

$C_{w\text{-}SS}$ = pitoisuus vedessä tasapainotilassa (mg l^{-1}).

k_1:n ja k_2:n suhde on kineettinen BCF (BCF_K), jonka pitäisi vastata tasapainotilan BCF-arvoa (BCF_{SS}), joka saadaan vertaamalla tasapainotilan pitoisuutta kaloissa vastaavaan pitoisuuteen vedessä. Poikkeamia voi kuitenkin esiintyä, jos tasapainotilan saavuttaminen ei ole varmaa tai kineettistä BCF:ää on korjattu kasvun mukaan. BCF_K-arvon johtaminen ei kuitenkaan edellytä tasapainotilan saavuttamista, koska $k_1$ja k_2 ovat vakioita.

Tässä lisäyksessä esitetään kyseisiin ensimmäisen asteen yhtälöihin perustuvat yleiset laskelmat, joita tarvitaan sekä veden että ravinnon välityksellä tehtävissä altistuksissa biokertyvyyden määrittämiseksi. Osat 5, 6 ja 8 koskevat vain veden välityksellä tehtävää altistusta, mutta ne ovat tässä mukana ”yleisinä” tekniikoina. Vaiheittaisilla menetelmillä (osat 4 ja 5) ja samanaikaismenetelmillä (osa 6) voidaan laskea kertymä- ja poistumavakiot, joita käytetään kineettisten BCF-arvojen laskennassa. Vaiheittainen menetelmä k_2:n määrittämiseksi (osa 4) on tärkeä ravintoaltistusmenetelmässä, koska sitä tarvitaan sekä assimilaatiotehon että BMF:n laskemisessa. Ravintoaltistusta soveltavassa menetelmässä tarvittavat erityislaskelmat esitetään yksityiskohtaisesti lisäyksessä 7.

2. KERTYMÄVAIHEEN KESTON ARVIOIMINEN

Ennen testin suorittamista voidaan arvioida k_2 ja määrittää jokin prosenttimäärä tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavasta ajasta k_2:n ja n-oktanoli-vesi -jakautumiskertoimen (K_{OW}) tai k_1:n ja BCF:n välisten empiiristen suhteiden perusteella. On kuitenkin pidettävä mielessä, että tässä osassa esitellyt yhtälöt soveltuvat vain silloin, kun kertymä ja poistuma noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos näin ei selvästikään ole ja kertymävaiheesta halutaan antaa ennusteita, kannattaa pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta.

Arvo k_2 (vrk^{-1}) voidaan arvioida monella eri menetelmällä. Ensisijaisesti voidaan käyttää esimerkiksi seuraavaa empiiristä suhdetta ([1]):

$$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW} \qquad (r^2 = 0{,}95)\ \text{[(3); Yhtälö A5.5]}$$

tai

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \qquad \text{[Yhtälö A5.6]}$$

Jossa: $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (aineet, joiden $\log K_{OW} > 3$) $(r^2 = 0{,}85)$ [(4); Yhtälö A5.7]

ja $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot \log K_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ $(r^2 = 0{,}90)$ [(5); Yhtälö A5.8]

([1]) Kuten kaikissa empiirisissä suhteissa, tässäkin on varmistettava, että testiaineeseen voidaan soveltaa kyseistä suhdetta.

W = käsiteltyjen kalojen keskipaino (grammaa tuorepainona) kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa ([1])

Muista olennaisista suhteista *ks.* (6). K_2:n arvioinnissa voi olla hyödyllistä käyttää monimutkaisempia malleja, jos esimerkiksi merkittävä metaboloituminen on todennäköistä (7) (8). Mitä monimutkaisempaa mallia käytetään, sitä huolellisempi on oltava ennusteiden tulkinnassa. Esimerkiksi nitroryhmien esiintyminen voi olla merkki nopeasta metaboloitumisesta, mutta aina näin ei ole. Käyttäjän pitäisikin arvioida ennustemenetelmällä saatuja tuloksia kemiallisen rakenteen ja muiden olennaisten tietojen (kuten alustavien tutkimusten tulosten) perusteella tutkimuksen aikataulua suunnitellessaan.

Aika, joka tarvitaan tietyn prosenttiasteisen tasapainotilan saavuttamiseksi, voidaan laskea arvioidun k_2:n perusteella yleisestä kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yhtälöstä (ensimmäisen asteen kinetiikka) olettaen, että kasvu ja metaboloituminen ovat vähäisiä. Jos kalat kasvavat merkittävästi tutkimuksen aikana, alla kuvatut arviot eivät ole luotettavia. Tällaisissa tapauksissa on parempi soveltaa kasvukorjattua arvoa k_{2g}, kuten esitetään jäljempänä (ks. tämän liitteen osa 7):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.9]}$$

tai jos C_w on vakio:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.10]}$$

Kun lähestytään tasapainotilaa ($t \rightarrow \infty$), yhtälö A5.10 voidaan muuttaa (ks. (9) (10)) seuraavasti:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Yhtälö A5.11]}$$

tai

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Yhtälö A5.12]}$$

Tällöin BCF × C_w on lähellä pitoisuutta kalassa tasapainotilassa ($C_{f\text{-}SS}$). Huomautus: Samaa lähestymistapaa voidaan soveltaa arvioitaessa tasapainotilan BMF:ää ravinnon välityksellä tehtävässä testissä. Tällöin edellä esitetyissä yhtälöissä korvataan BCF BMF:llä ja C_w ruoassa mitatulla pitoisuudella C_{ruoka}.

Yhtälö A5.10 voidaan kirjoittaa seuraavasti:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.13]}$$

tai

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Yhtälö A5.14]}$$

Soveltamalla yhtälöä A5.14 voidaan arvioida aika, joka vaaditaan jonkin prosenttiasteen tasapainotilan saavuttamiseksi, kun k_2 on arvioitu ensin soveltamalla yhtälöä A5.5 tai A5.6.

Tilastollisesti paras kertymävaiheen kesto tilastollisesti hyväksyttävien tulosten saamiseksi (BCF_K) on aika, joka tarvitaan, jotta kalassa olevan testiainepitoisuuden logaritmia lineaarisen ajan funktiona kuvaava käyrä osoittaa vähintään 50-prosenttisen tasapainotilan (eli $0{,}69/k_2$), mutta ei saavuta enempää kuin 95 prosenttia tasapainotilasta (eli $3{,}0/k_2$) (11). Jos akkumulaatio saavuttaa yli 95 prosenttisesti tasapainotilan, voidaan laskea BCF_{SS}.

([1]) Kalojen paino kertymävaiheen lopussa voidaan arvioida aiempien tutkimustulosten perusteella tai sen mukaan, miten testattavan lajin tiedetään kasvavan tavanomaisen kertymävaiheen (jonka kesto on esimerkiksi 28 vuorokautta) aikana verrattuna normaalipainoon testin alussa.

Aika, joka tarvitaan 80-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen on (yhtälö A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t}$$ [Yhtälö A5.15]

tai

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2}$$ [Yhtälö A5.16]

Samaten aika, joka tarvitaan 95-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen, on:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$ [Yhtälö A5.17]

Esimerkiksi kertymävaiheen kesto (eli aika, joka tarvitaan tietyn prosenttiosuuden saavuttamiseksi tasapainotilasta, esim. t_{80} tai t_{95}) aineella, jonka log K_{OW} = 4, olisi seuraava (kun käytetään yhtälöitä A5.5, A5.16 ja A5.17):

$$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ vrk}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \ \textit{days} \ (59 \text{ tuntia})$$

tai kun käytetään $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60$ vrk (110 tuntia)

vaihtoehtoisesti seuraavaa yhtälöä:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \ (\textit{tuntia})$$ [Yhtälö A5.18]

tosiasiallisen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavan ajan (t_{eSS}) laskemiseen (12). Aineella, jonka log K_{OW} = 4, tulos on seuraavanlainen:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \ \textit{tuntia}$$

3. POISTUMAVAIHEEN KESTON ARVIOIMINEN

Ennakkoarvio ajasta, joka tarvitaan kertymän laskemiseksi tiettyyn prosenttimäärään alkupitoisuudesta, voidaan myös saada kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yleisestä yhtälöstä (kun oletuksena on ensimmäisen asteen kinetiikka, ks. yhtälö A5.9) (1) (13).

Poistumavaiheen C_w-arvoksi (tai C_{ruoka}-arvoksi, jos on kyse ravintoaltistustestistä) oletetaan nolla. Yhtälö voidaan tällöin esittää seuraavasti:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f$$ [Yhtälö A5.19]

tai

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$ [Yhtälö A5.20]

jossa $C_{f,0}$ on pitoisuus poistumavaiheen alussa.

Siten saavutetaan 50 prosentin poistuma ajankohtana (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

tai

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Samaten 95 prosentin poistuma saavutetaan seuraavana ajankohtana:

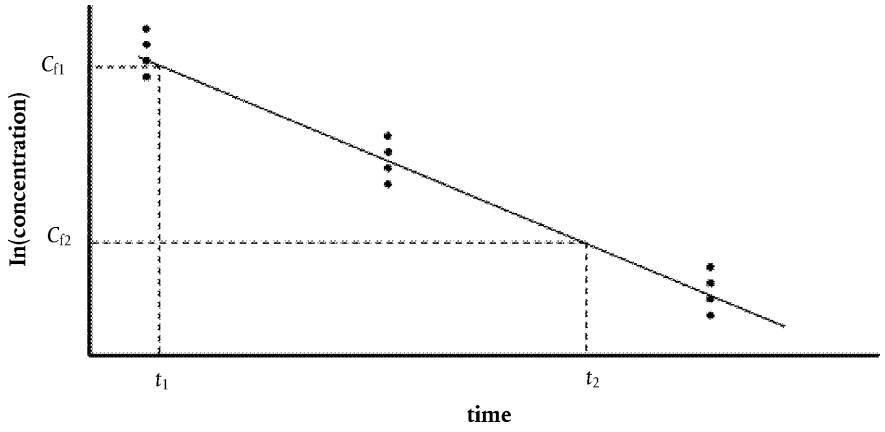
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Jos 80 prosentin kertymää käytetään ensimmäisessä vaiheessa ($1{,}6/k_2$) ja 95 prosentin poistumaa poistumavaiheessa ($3{,}0/k_2$), niin poistumavaihe on suunnilleen kaksi kertaa niin pitkä kuin kertymävaihe.

On huomattava, että arviot perustuvat oletukseen, että kertymä- ja poistumavaihe noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos ne eivät selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, nämä arviot eivät päde.

4. VAIHEITTAINEN MENETELMÄ: POISTUMAVAKION K_2 MÄÄRITTÄMINEN

Biokertyvyystietojen on yleensä oletettu noudattavan "kohtuullisesti" yksinkertaista kahden osaston ja kahden muuttujan mallia. Sen osoittaa suora kuvaaja, joka vastaa kalassa poistumavaiheessa havaittuja pitoisuuksia (lineaarisella asteikolla).



On huomattava, että poikkeamat suorasta viivasta voivat viitata siihen, että poistuma noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa monimutkaisempaa mallia. Graafista menetelmää voidaan käyttää sellaisten poistumatyyppien selvittämiseen, jotka poikkeavat ensimmäisen asteen kinetiikasta.

Jos halutaan laskea k_2 eri (näytteenotto-)ajankohtina, tehdään lineaarinen regressio, jossa verrataan ln (konsentraatiota) aikaan. Regressiosuoran kulmakerroin osoittaa arvioidun poistumavakion k_2 [1]. Keskimääräinen pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alussa ($C_{0,d}$, joka vastaa keskimääräistä pitoisuutta kaloissa kertymävaiheen lopussa) voidaan laskea helposti leikkauspisteestä (myös virhemarginaali huomioitu) [1]:

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[Yhtälö A5.21]}$$

[1] Useimmissa lineaarisen regression mahdollistavissa ohjelmissa saadaan myös keskivirhetaso ja luottamusväli. Tämä onnistuu esimerkiksi Microsoft Excelissä käyttämällä data-analysoinnin työkalupakettia.

Jos näytteenottoajankohtia on vain kaksi (kuten minimoidussa testissä), k_2 lasketaan korvaamalla kaksi keskimääräistä pitoisuutta seuraavassa yhtälössä:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Yhtälö A5.22]}$$

jossa $\ln(C_{f1})$ on pitoisuuden luonnollinen logaritmi ajankohtana t_1 ja $\ln(C_{f2})$ ajankohtana t_2 ja jossa t_2 ja t_1 osoittavat, minä ajankohtina kaksi poistumavaiheen alussa otettua näytettä on otettu [1].

5. VAIHEITTAINEN MENETELMÄ: KERTYMÄVAKION K_1 MÄÄRITTÄMINEN (VAIN VEDEN VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVÄSSÄ ALTISTUKSESSA)

K_1:n arvon määrittämiseksi kertymävaiheen tiettyinä ajankohtina mitattuja pitoisuuksia koskevien tietojen perusteella käytetään tietokoneohjelmaa seuraavan mallin sovittamiseksi:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.23]}$$

Jos k_2 on saatu aiemmassa laskutoimituksessa, $C_f(t)$ osoittaa pitoisuuden kaloissa ja $C_w(t)$ vedessä ajankohtana t.

Jos näytteenottopisteitä on vain kaksi (kuten minimoidussa testissä), k_1:n laskemisessa sovelletaan seuraavaa kaavaa:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Yhtälö A5.24]}$$

jossa k_2 saadaan aiemmasta laskutoimituksesta, C_f on pitoisuus kalassa poistumavaiheen alkaessa ja C_w on keskimääräinen pitoisuus vedessä kertymävaiheen aikana [2].

Sovituksen oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla silmämääräisesti k_1:n ja k_2:n kulmakertoimia näytteenottopisteestä saatuihin mittaustietoihin. Jos käy ilmi, että vaiheittaisen menetelmän mukaan tehty arvio k_1:stä on heikko, k_1 ja k_2 pitäisi laskea samanaikaismenetelmällä (ks. seuraava osa 6). Tässäkin on verrattava saatuja kulmakertoimia mitattuihin tietoihin, jotta sovituksen oikeellisuus voidaan tarkastaa silmämääräisesti. Jos sovituksen oikeellisuus on edelleen heikko, se voi olla merkki siitä, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, jolloin pitäisi soveltaa monimutkaisempia malleja.

6. KERTYMÄ- JA POISTUMAVAKIOIDEN LASKENNASSA SOVELLETTAVA SAMANAIKAISMENETELMÄ (VAIN VEDEN VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVÄ ALTISTUS)

Tietokoneohjelmien avulla voidaan määrittää k_1 ja k_2-arvot peräkkäisiä ajankohtia koskevia pitoisuustietoja ja seuraavaa mallia soveltaen:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö A5.26]}$$

joissa

t_c = aika, jolloin kertymävaihe loppuu.

[1] Sen sijaan lineaarisessa regressiomenetelmässä tämän kaavan avulla ei voida määrittää k2:n keskivirhetasoa.
[2] Sen sijaan lineaarisessa sovitusmenetelmässä k1:n arvioitua arvoa koskevaa keskivirhetasoa tai luottamusväliä ei yleensä voida määrittää tällä tavalla.

Tässä lähestymistavassa k_1- ja k_2-arvioiden keskivirhetaso voidaan määrittää suoraan. Jos k_1/k_2 korvataan BCF:llä (ks. yhtälö A5.4) yhtälöissä A5.25 ja A5.26, voidaan arvioida myös BCF:n keskivirhetaso ja 95 prosentin luottamusväli. Tästä on erityistä hyötyä verrattaessa arvioita, jotka eroavat toisistaan tietojen muuntamisen takia. Riippuva muuttuja (pitoisuus kaloissa) voidaan sovittaa lineaarisen muutoksen kanssa tai ilman sitä, ja tuloksena saatava BCF:n epävarmuus voidaan arvioida.

Koska muuttujien k_1 ja k_2 välillä on voimakas korrelaatio, jos ne on arvioitu samanaikaisesti, voi olla kannattavaa laskea ensin k_2 pelkästään poistumatietojen perusteella (ks. edellä). Useimmissa tapauksissa k_2 voidaan arvioida poistumakäyrästä suhteellisen tarkasti. Tämän jälkeen voidaan laskea k_1 kertymätietojen perusteella käyttämällä ei-lineaarista regressiota ([1]). Tiedot on suositeltavaa muuntaa samalla tavalla vaiheittaisessa sovittamisessa.

Sovituksen oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla silmämääräisesti laskettuja kulmakertoimia näytteenottopisteestä saatuihin mittaustietoihin. Jos käy ilmi, että tämän menetelmän mukaan tehty arvio k_1:stä on heikko, k_1 ja k_2 voidaan laskea samanaikaismenetelmällä. Tässäkin tapauksessa sovitetun mallin sopivuus pitäisi tarkistaa silmämääräisesti vertaamalla sitä mittaustietoihin. Lisäksi pitäisi vertailla keskenään eri sovitustyypeille arvioituja k_1- ja k_2-muuttujia ja saatua BCF:ää sekä niiden keskivirhetasoa ja luottamusväliä.

Sovituksen heikkous saattaa tarkoittaa, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, jolloin on käytettävä monimutkaisempia malleja. Yksi yleisimmistä ongelmista on kalojen kasvu testin aikana.

7. KINEETTISEN BCF:N JA BMF:N KORJAAMINEN KASVUN MUKAAN

Tässä osassa esitellään standardi menetelmä arvojen korjaamiseksi kalojen kasvun mukaan (niin kutsuttu kasvun aiheuttama liukeneminen). Sitä voidaan soveltaa vain silloin, kun ensimmäisen asteen kinetiikka pätee. Jos vaikuttaa siltä, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, on suositeltavaa pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta, jotta kasvun aiheuttama liukeneminen voidaan huomioida oikein korjaamisessa tai jotta voidaan käyttää massaperusteista lähestymistapaa, joka esitellään jäljempänä.

Joissakin tapauksissa tämä kasvun aiheuttamaan liukenemiseen perustuva korjausmenetelmä on epätarkka tai se ei toimi. (Näin on esimerkiksi silloin, kun testiaine poistuu hyvin hitaasti mutta kalojen kasvu on nopeaa, jolloin kasvun aiheuttaman liukenemisen perusteella korjattu johdettu poistumavakio k_{2g} saattaa olla hyvin pieni ja virhe sen johtamisessa käytetyissä vakioissa on kriittinen. Joissakin tapauksissa arvioitu k_g saattaa olla suurempi kuin k_2.) Tällöin voidaan soveltaa vaihtoehtoista (eli massaperusteista) lähestymistapaa, joka toimii myös silloin, kun ensimmäisen asteen kinetiikka ei päde. Tällöin ei tarvitse tehdä korjauksia. Tätä lähestymistapaa käsitellään osan lopussa.

Kasvuvakion vähennysmenetelmä korjaamiseksi kasvun mukaan

Standardimenetelmässä yksittäisten kalojen painot ja pituudet muunnetaan luonnollisiksi logaritmeiksi ja sekä käsittely- että vertailuryhmien ln(paino)- tai ln(l/paino)-arvoja verrataan erikseen aikaan (vrk). Kertymä- ja poistumavaiheen tiedot käsitellään samalla tavalla erikseen. Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävässä korjauksessa on tavallisesti parempi käyttää koko tutkimuksen ajalta saatuja painotietoja poistumavakion (k_g) johtamiseksi. Jos kertymä- ja poistumavaiheita varten johdetuissa kasvuvakioissa on tilastollisesti suuria eroja, voi olla tarpeen käyttää poistumavakiota. Vesitutkimuksissa saatuja testi- ja vertailuryhmien yleisiä kasvuvakioita voidaan käyttää käsittelyn mahdollisten vaikutusten tarkistamiseksi.

([1]) On huomattava, että k2-arvioon liittyvää epävarmuutta ei hyödynnetä kunnolla biokertyvyysmallissa, jos se luokitellaan pääasiassa vakioksi sovitettaessa k1:tä vaiheittaisen sovituksen malliin. Näin ollen BCF:lle saatu epävarmuus on erilainen riippuen siitä, sovelletaanko samanaikaista vai vaiheittaista sovitusmenetelmää.

Lineaarinen pienin neliösumma lasketaan, jotta saadaan lineaarinen eli ln(kalojen paino) vuorokautta kohti (tai ln (1/paino) vuorokautta kohti) kussakin ryhmässä (testi- ja vertailuryhmissä ja yksilökohtaisten tietojen perusteella, ei päivittäisten keskiarvojen mukaan) koko testiajalta. Kertymä- ja poistumavaiheiden osalta käytetään standardeja tilastomenetelmiä. Suorien leikkauspisteiden varianssit lasketaan, ja niitä käytetään leikkauspisteiden välisten erojen (kasvuvakiot) tilastollisen merkityksen arvioimiseksi (p = 0,05) Studentin t-testillä (tai ANOVA-testillä, jos testataan useampia pitoisuuksia). Kasvun mukaan tehtävässä korjaamisessa suositaan yleisesti painotietoja. Pituustiedot käsitellään samalla tavalla, ja niitä voidaan hyödyntää vertailtaessa käsittelystä johtuvia vaikutuksia vertailu- ja testiryhmissä. Jos painotiedoissa ei analyysin mukaan ole tilastollisesti merkittävää eroa, testi- ja vertailuryhmien tiedot voidaan yhdistää ja koko tutkimusta varten laskea kalojen yleinen kasvuvakio (k_g) lineaarisen korrelaation yleisestä kaltevuudesta. Jos havaitaan tilastollisesti merkittäviä eroja, kunkin kalaryhmän ja/tai tutkimusvaiheen kasvuvakiot ilmoitetaan erikseen. Kunkin käsitellyn ryhmän kasvuvakioita käytetään kyseisen ryhmän osalta kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävässä korjaamisessa. Jos kertymä- ja poistumavakioissa havaitaan tilastollisesti merkittäviä eroja, käytetään poistumavaiheen johdettuja kasvuvakioita.

Laskettu kasvuvakio (k_g ilmaistuna vrk^{-1}) voidaan vähentää yleisestä poistumavakiosta (k_2), jolloin saadaan poistumavakio k_{2g}.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Yhtälö A5.27]}$$

Kertymävakio jaetaan kasvukorjatulla poistumavakiolla, jolloin saadaan kasvukorjattu kineettinen BCF, eli BCF_{Kg} (tai BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A5.28]}$$

Ravinnon välityksellä tehtävää tutkimusta varten johdettua kasvuvakiota käytetään myös yhtälössä A7.5 kasvukorjatun BMF_{Kg}:n määrittämiseksi (*ks.* lisäys 7).

Massaperusteinen menetelmä kasvun mukaan korjaamisessa

Seuraavassa kuvattua menetelmää voidaan käyttää edellä kuvatun ”kasvuvakion vähennysmenetelmän” sijasta, jolloin arvoja ei tarvitse korjata kasvun takia. Periaatteena on, että poistumatietoja käytettäessä huomioidaan kokonaisten kalojen massa pitoisuuden sijasta.

Poistumavaiheessa kudoksista mitatut pitoisuudet (testiaineen massa / kalojen massayksikkö) muunnetaan testiaineen massaksi suhteessa kaloihin. Sitten pitoisuudet ja yksittäisten kalojen painot yhdistetään taulukkoon (esimerkiksi tietokonepohjaista laskentataulukkoa käyttäen) ja jokainen pitoisuus kerrotaan kyseisellä mittauskerralla saadulla kalojen yhteispainolla, jolloin saadaan testiaineen massa suhteessa kaloihin kaikissa poistumavaiheen näytteissä.

Tuloksena saatua testiaineen massatietojen luonnollista logaritmia verrataan kokeen ajankohtaan (poistumavaihe), kuten yleensäkin.

Vesialtistusmenetelmässä kertymävakio johdetaan rutiininomaisesti (ks. osat 4 ja 6). On huomattava, että ”normaalia” k_2-arvoa pitäisi käyttää käyrien sovitusyhtälöissä k_1-arvon osalta ja johtaa poistumavakio edellä mainituista tiedoista. Poistumavakioksi saatava arvo ei ole riippuvainen kasvusta, koska se on johdettu massaperusteisesti kokonaisten kalojen painon perusteella. Näin ollen sen tunnuksena on k_{2g},ei k_2.

8. RASVAPITOISUUDEN NORMALISOINTI VIIDEN PROSENTIN RASVAPITOISUUDEN MUKAISESTI (KOSKEE AINOASTAAN VESIALTISTUSMENETELMÄÄ)

Vesialtistustesteissä saadut (kineettiset ja tasapainotilan) BCF-tulokset pitäisi myös ilmoittaa suhteessa kalojen viiden prosentin vakiorasvapitoisuuteen (tuorepainosta), paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan (esimerkiksi jotkut perfluoratut aineet saattavat sitoutua proteiineihin). Pitoisuus kaloissa, tai BCF, on muunnettava vastaamaan viiden prosentin rasvapitoisuutta tuorepainoon nähden. Jos testiaineen pitoisuus ja rasvapitoisuus on mitattu samoista kaloista kaikissa näytteenottopisteissä, jokainen yksittäiseltä kalalta mitattu pitoisuus on korjattava kyseisen kalan rasvapitoisuuden mukaan.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.29]}$$

jossa

$C_{f,L}$ = rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu pitoisuus kaloissa (mg kg^{-1} tuorepaino)

L = rasvan osuus (tuorepainon perusteella)

C_f = testiaineen pitoisuus kaloissa (mg kg^{-1} tuorepaino)

Jos rasvapitoisuutta ei ole analysoitu kaikista näytteeksi otetuista kaloista, BCF normalisoidaan keskimääräisen rasvapitoisuuden perusteella. Tasapainotilan BCF määritetään kertymävaiheen lopussa käsittelyryhmän kaloille kirjatun keskiarvon perusteella. Kineettisen BCF:n normalisoinnissa saatetaan joissakin tapauksissa tarvita toisenlaista lähestymistapaa. Näin on esimerkiksi silloin, kun rasvapitoisuus on muuttunut huomattavasti joko kertymä- tai poistumavaiheen aikana. Ruokkimistaajuuden pitäisi kuitenkin aina olla sellainen, ettei rasvapitoisuudessa juuri tapahdu dramaattisia muutoksia.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Yhtälö A5.30]}$$

jossa

BCF_{KL} = rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen BCF (L kg^{-1})

L = rasvan keskimääräinen osuus (tuorepainon perusteella)

BCF_K = kineettinen BCF (L kg^{-1})

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Arnot J.A. ja Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355

(2) Tässä liitteessä oleva C.20 luku, Lisääntymistesti vesikirpulla (Daphnia magna)

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309–320.

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29–39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168–1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243–255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614–622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3–19.

Lisäys 6

YHTÄLÖT VESIALTISTUSTESTISSÄ: MINIMOITU TESTIJÄRJESTELY

Tämän lähestymistavan perusteena on, että kattavassa testissä biokertyvyystekijä voidaan määrittää joko tasapainotilan biokertyvyystekijänä (BCF_{SS}) vertaamalla toisiinsa testiaineen pitoisuutta kaloissa ja vedessä tai kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) laskemalla kertymävakion k_1 ja poistumavakion k_2 välinen suhde. BCF_K on pätevä siinäkin tapauksessa, ettei aineen pitoisuudessa saavuteta kertymävaiheen aikana tasapainotilaa, mikäli kertymä ja poistuma noudattavat likimäärin ensimmäisen asteen kineettisiä prosesseja.

Jos testiaineen pitoisuus kudoksissa (C_{f1}) mitataan altistuksen päättyessä (t_1) ja sama pitoisuus mitataan uudelleen (C_{f2}) tietyn ajan kuluttua (t_2), poistumavakio (k_2) voidaan arvioida soveltamalla lisäyksessä 5 kuvattua yhtälöä A5.22.

Tämän jälkeen kertymävakio k_1 voidaan määrittää matemaattisesti soveltamalla liitteessä 5 esitettyä yhtälöä A5.23 (jossa C_f on sama kuin C_{f1} ja t sama kuin t_1) (1). Minimoidussa testijärjestelyssä kineettinen biokertyvyystekijä (jota kuvataan tunnuksella BCF_{Km} sen erottamiseksi muilla menetelmillä määritetyistä kineettisistä biokertyvyystekijöistä) on seuraavanlainen:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A6.1]}$$

Pitoisuudet tai tulokset on korjattava kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan ja normalisoitava kalojen viiden prosentin rasvapitoisuuden perusteella, kuten todetaan liitteessä 5.

Minimoidussa testijärjestelyssä BCF_{SS} vastaa kertymävaiheen lopussa mitattua BCF:ää kun oletuksena on, että tasapainotila on saavutettu. Tämä on vain oletus, koska näytteenottopisteiden määrä ei riitä vahvistamaan tietoa.

$$\text{minimoitu } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[Yhtälö A6.2]}$$

jossa

$C_{f\text{-}minSS}$ = pitoisuus kaloissa oletetussa tasapainotilassa kertymävaiheen lopussa (mg kg^{-1} tuorepaino).

$C_{w\text{-}minSS}$ = pitoisuus vedessä oletetussa tasapainotilassa kertymävaiheen lopussa (mg l^{-1}).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. ja Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280

Lisäys 7

YHTÄLÖT RAVINTOALTISTUSTESTISSÄ

1. Esimerkki sopivan kaupallisesti saatavan kalanruoan eri ainesosien määristä

2. Esimerkkejä tekniikoista testiaineen lisäämiseksi ruokaan

3. Assimilaatiotehon ja biomagnifikaatiokertoimen laskeminen

4. Korjaaminen rasvapitoisuuden mukaan

5. Nolla-ajankohdan mitatun pitoisuuden (C0,m) ja nolla-ajankohdan johdetun pitoisuuden (C0,d) välisten erojen arviointi

6. Ohjeita testiaineille, joilla poistuma on hyvin nopeaa

1. ESIMERKKI SOPIVAN KAUPALLISESTI SAATAVAN KALANRUOAN ERI AINESOSIEN MÄÄRISTÄ

Pääainesosa	Kalajauho
Raakavalkuainen	≤ 55,0 %
Raakarasva	≤ 15,0 % [1]
Raakakuitu	≥ 2,0 %
Kosteuspitoisuus	≥ 12 %
Tuhka	≥ 8 %

[1] Joillain alueilla saatavilla on mahdollisesti vain kalanruokaa, jonka rasvapitoisuus on kaukana tästä ylärajasta. Tällöin tutkimuksessa käytetään ruokaa, jonka rasvapitoisuus on pienempi, ja ruokkimistaajuutta muutetaan asianmukaisesti kalojen terveyden ylläpitämiseksi. Ruokavalion rasvapitoisuutta ei kasvateta keinotekoisesti öljyä lisäämällä.

2. ESIMERKKEJÄ TEKNIIKOISTA TESTIAINEEN LISÄÄMISEKSI RUOKAAN

Yleistä

Vertailuryhmälle annettava ruoka pitäisi valmistaa muuten täysin samalla tavalla kuin testiainetta sisältävä ruoka, mutta siihen ei lisätä testiainetta.

Käsitellyn ruoan pitoisuuden tarkistamiseksi ruoka-annoksesta otetaan kolme näytettä soveltuvalla talteenottomenetelmällä ja niistä mitataan testiaineen pitoisuus tai radioaktiivisuus. On osoitettava suuri saanto analyysia varten (> 85 %) siten, että näytteiden välinen vaihtelu on pientä (testiaineen pitoisuus kolmessa ennen testin alkua otetussa näytteessä ei saisi poiketa enemmän kuin ± 15 prosenttia keskiarvosta).

Ravintoaltistustestissä pitäisi kerätä analysoitavaksi kolme näytettä päivänä 0 sekä kertymävaiheen lopussa, jotta voidaan määrittää testiaineen pitoisuus ruoassa.

Kalanruoan valmistaminen testimateriaalin ollessa nestemäistä (puhdasta)

Käsitellylle kalanruoalle määritetään nimellinen tavoitearvo testiaineen pitoisuutta varten. Se voi olla esimerkiksi 500 µg testiainetta grammassa ruokaa. Sopiva määrä (moolimassana tai tietyn radioaktiivisuuden perusteella) puhdasta testiainetta lisätään tiettyyn määrään kalanruokaa lasipurkissa tai pyöröhaihdutuspullossa. Kalanruoan massan pitäisi olla sellainen, että se riittää poistumavaiheen ajaksi (ottaen huomioon, että annosmäärää pitää kasvattaa jokaisella ruokintakerralla kalojen kasvun mukaisesti). Kalanrehun ja testiaineen pitäisi antaa sekoittua keskenään yön yli hitaasti pyörivässä sekoittimessa (esimerkiksi pyörivän sekoittimen tai rotaatiomenetelmän avulla, jos käytössä on pyöröhaihdutuspullo). Testiainetta sisältävä ruoka pitäisi varastoida ennen käyttöä siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana käyttöön asti.

Kalanruoan valmistaminen, kun kantaja-aineena käytetään maissi- tai kalaöljyä

Kiinteät testiaineet jauhetaan morkkelissa hienoksi jauheeksi. Nestemäiset testiaineet voidaan lisätä suoraan maissi- tai kalaöljyyn. Testiaine liuotetaan tiettyyn määrään maissi- tai kalaöljyä (esim. 5–15 ml). Öljyannos siirretään kvantitatiivisesti sopivan kokoiseen pyöröhaihdutuspulloon. Öljyannoksen valmistelussa käytetty pullo pitäisi huuhdella kahdella pienellä öljyalikvootilla, jotka lisätään pulloon sen varmistamiseksi, että liuennut testiaine saadaan siirrettyä kokonaisuudessaan. Jotta aine liukenisi tai hajoaisi varmasti öljyyn (tai jos testataan useampaa kuin yhtä ainetta), käytetään lisäksi mikrosekoitinta, pullo suljetaan ja seosta sekoitetaan nopealla tahdilla yön yli. Testin kannalta sopiva määrä kalanruokaa (yleensä pelletteinä) lisätään pulloon ja pullon sisältö sekoitetaan tasalaatuiseksi pyörittämällä pulloa yhtäjaksoisesti vähintään 30 minuutin ajan, kuitenkin mieluiten yön yli. Tämän jälkeen testiainetta sisältävä ruoka varastoidaan asianmukaisesti (esim. kylmässä) sen varmistamiseksi, että testiaineen laatu pysyy ruoassa vakaana käyttöön asti.

Kalanruoan valmistaminen, kun käytetään orgaanista liuotinta

Riittävä määrä testiainetta (moolimassan tai erityisen radioaktiivisuuden mukaan) tavoitellun annoksen saamiseksi liuotetaan sopivaan orgaaniseen liuottimeen (esim. sykloheksaanilla tai asetonilla määrä on 10–40 ml; tarvittava määrä voi olla suurempi riippuen siitä, mihin määrään ruokaa testiainetta on tarkoitus lisätä). Liuoksen alikvootti tai liuos kokonaisuudessaan (riippuen lisätystä annoksesta) sekoitetaan sellaiseen massaan kalanruokaa, joka riittää testissä vaaditun nimellisen annoskoon saamiseksi. Ruoka ja testiaine voidaan sekoittaa keskenään ruostumattomassa sekoitusmaljassa ja tuoreena annosteltu kalanruoka voidaan jättää laboratoriokaappiin kahdeksi vuorokaudeksi (välillä sekoittaen) ylimääräisen liuottimen haihduttamiseksi, tai ne voidaan sekoittaa pyöröhaihdutuspullossa jatkuvalla rotaatiolla. Ylimääräinen liuotin voidaan tarvittaessa ”puhaltaa” pois ilmavirran tai typpikaasun avulla. Tällöin on varmistettava, ettei testiaine kiteydy liuottimen haihtuessa. Testiainetta sisältävä ruoka pitäisi varastoida siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana käyttöön asti.

3. ASSIMILAATIOTEHON JA BIOMAGNIFIKAATIOKERTOIMEN LASKEMINEN

Assimilaatiotehon laskemista varten on ensin arvioitava yleinen poistumavakio liitteen 5 osassa 4 kuvatulla tavalla (vaiheittaista menetelmää eli standardia lineaarista regressiota soveltaen) ja käyttäen poistumavaiheessa otettujen näytteiden keskipitoisuutta. Ruokkimistaajuusvakio I ja kertymävaiheen kesto t ovat tiedossa olevat tutkimusparametrit. C_{ruoka}, eli testiaineen keskimääräinen pitoisuus ruoassa on muuttuja, jota tutkimuksessa mitataan. $C_{0,d}$, eli testiaineen pitoisuus kaloissa kertymävaiheen lopussa, johdetaan tavallisesti ln(konsentraation) ja poistumavaiheen kyseisen päivän leikkauspisteestä.

Aineen assimilaatioteho (a, testiaineen absorboituminen suolistossa) lasketaan seuraavasti:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{ruoka}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Yhtälö A7.1]}$$

jossa

$C_{0,d}$ = johdettu pitoisuus kaloissa poistumavaiheen nolla-ajankohtana (mg kg^{-1})

k_2 = yleinen (ei kasvukorjattu) poistumavakio (vrk^{-1}), joka on laskettu liitteen 5 osassa 3 esitettyjen yhtälöiden mukaisesti

I = ruoan imeytymisvakio (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1})

C_{ruoka} = pitoisuus ruoassa (mg kg^{-1} ruokaa)

t = ruokintajakson kesto (vrk)

Laskennassa käytettyä ruokkimistaajuutta I voidaan kuitenkin joutua korjaamaan kalan kasvun mukaan tarkan assimilaatiotehon a määrittämiseksi. Jos kalat kasvavat merkittävästi testin kertymävaiheen aikana (eikä annettuja rehumääriä korjata valitun ruokkimistaajuuden ylläpitämiseksi), todellinen ruokkimistaajuus pienenee kertymäajan edetessä asetettuun määrään nähden, jolloin "todellinen" assimilaatioteho on suurempi. (Huomaa, ettei tällä ole merkitystä BMF:n yleisessä laskennassa, koska I kumoaa tosiasiassa yhtälöiden A7.1 ja A7.4 keskinäisen vaikutuksen.) Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan korjattu keskimääräinen ruokkimistaajuus I_g voidaan johtaa useilla eri tavoilla, mutta yksinkertaisin ja perusteellisin tapa on käyttää tiedossa olevaa kasvuvakiota (k_g) testikalojen painon arvioimiseksi kertymävaiheen eri ajankohtina:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Yhtälö A7.2]}$$

jossa

$W_f(t)$ = kalojen keskipaino kertymävaiheen päivänä t

$W_{f,0}$ = kalojen keskipaino kokeen alkaessa.

Näin voidaan arvioida (vähintään) kalojen keskipaino altistuksen viimeisenä päivänä ($W_{f,\text{altistuksen loppu}}$). Koska ruokkimistaajuuden määritysperusteena on ollut $W_{f,0}$, todellinen ruokkimistaajuus kunakin kertymävaiheen päivänä voidaan laskea kyseisten kahden painon arvon perusteella. Kasvukorjattu ruokkimistaajuus I_g (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1}), jota on käytettävä I:n sijasta, jos kalat kasvavat nopeasti kertymävaiheessa, voidaankin laskea seuraavasti:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{altistuksen loppu}}} \qquad \text{[Yhtälö A7.3]}$$

Kun assimilaatioteho on määritetty, BMF voidaan laskea kertomalla se ruokkimistaajuusvakiolla I (tai I_g, jos se on α:n laskentaperusteena) ja jakamalla tulo yleisellä poistumavakiolla k_2:

$$BMF = \frac{I \times a}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A7.4]}$$

Kasvukorjattu biomagnifikaatiokerroin pitäisi laskea samalla tavalla käyttäen kasvukorjattua poistumavakiota (joka on johdettu liitteen 5 osassa 7 kuvatulla tavalla). Jos α:n laskentaperusteena on ollut I_g, sitä pitäisi tässäkin käyttää I:n sijasta:

$$BMF = \frac{I \times a}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A7.5]}$$

jossa

α = assimilaatioteho (testiaineen absorboituminen suolistossa)

k_2 = yleinen (ei kasvukorjattu) poistumavakio (vrk^{-1}), joka on laskettu liitteen 5 osassa 3 esitettyjen yhtälöiden mukaisesti

k_{2g} = kasvukorjattu poistumavakio (vrk^{-1})

I = ruoan imeytymisvakio (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1})

Kasvukorjattu puoliintumisaika ($t_{1/2}$) lasketaan seuraavasti:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A7.6]}$$

Testiaineen assimilaatioteho ruoassa voidaan myös arvioida, jos kudoksissa todetaan jäämiä kertymävaiheen lineaarisessa vaiheessa (vuorokausien 1 ja 3 välisenä aikana). Tällöin assimilaatioteho (α) voidaan määrittää seuraavasti:

$$\alpha = \frac{C_{kala}(t)}{I \times C_{ruoka} \times t} \qquad \text{[Yhtälö A7.7]}$$

jossa

$C_{kala}(t)$ = testiaineen pitoisuus kaloissa ajankohtana t (mg kg^{-1} tuorepainosta).

4. KORJAAMINEN RASVAPITOISUUDEN MUKAAN

Jos rasvapitoisuus on kaikilla näytteenottoväleillä mitattu samoista kaloista, joille on tehty myös kemiallinen analyysi, yksittäiset pitoisuudet korjataan rasvapitoisuuden mukaan ja (rasvapitoisuuden mukaan korjattua) lineaarista konsentraatiota verrataan poistuma-ajankohtaan (vrk), jolloin voidaan määrittää $C_{0,d}$ ja k_2. Tämän jälkeen assimilaatioteho (yhtälö A7.1) voidaan laskea rasvapitoisuuden perusteella käyttämällä rasvapitoisuuteen perustuvaa arvoa C_{ruoka} (eli C_{ruoka} kerrotaan ruoan sisältämän rasvan keskiarvolla). Tämän jälkeen laskennassa käytettävät yhtälöt A7.4 ja A7.5 antavat suoraan tulokseksi rasvapitoisuuden (ja kasvun aiheuttaman liukenemisen) mukaan korjatun BMF:n.

Muutoin rasvan keskimääräinen osuus (tuorepainosta) kaloissa ja ruoassa johdetaan sekä käsittely- että vertailuryhmissä (ruoan ja vertailuryhmän kalojen osalta tavallisesti mittaustiedoista, jotka on saatu altistuksen alkaessa ja päättyessä; käsittelyryhmän kaloilla tavallisesti vain mittaustiedoista, jotka on saatu altistuksen päättyessä). Joissakin tutkimuksissa kalojen rasvapitoisuus voi nousta selvästi. Tällöin on parempi käyttää kalojen keskimääräistä rasvapitoisuutta, joka on laskettu altistusvaiheen ja poistumavaiheen lopussa mitatuista arvoista. Molempien rasvaosuuksien johtamisessa käytetään tavallisesti vain käsittelyryhmästä saatuja tietoja.

Rasvapitoisuuden korjauskerroin (L_c) lasketaan seuraavasti:

$$L_C = \frac{L_{kala}}{L_{ruoka}} \qquad \text{[Yhtälö A7.8]}$$

jossa L_{kala} on keskimääräinen rasvaosuus kaloissa ja L_{ruoka} on keskimääräinen rasvaosuus ruoassa.

Rasvapitoisuuden korjauskerrointa käytetään rasvakorjatun biomagnifikaatiokertoimen (BMF_L) laskennassa:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C}$$ [Yhtälö A7.9]

5. NOLLA-AJANKOHDAN MITATUN PITOISUUDEN ($C_{0,M}$) JA NOLLA-AJANKOHDAN JOHDETUN PITOISUUDEN ($C_{0,D}$) VÄLISTEN EROJEN ARVIOINTI

Nolla-ajankohdan mitattua pitoisuutta ($C_{0,m}$) ja nolla-ajankohdan johdettua pitoisuutta ($C_{0,d}$) pitäisi verrata toisiinsa. Jos ne ovat keskenään hyvin samanlaiset, poistumakauden muuttujat kannattaa johtaa käyttäen ensimmäisen asteen mallia.

Joissakin tutkimuksissa nolla-ajankohdan johdettu arvo $C_{0,d}$ saattaa poiketa selvästi nolla-ajankohdan mitatusta keskipitoisuudesta $C_{0,m}$ (ks. tätä testimenetelmää käsittelevän 159 kohdan viimeinen luetelmakohta). Jos $C_{0,d}$ on paljon pienempi kuin $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), se voi olla merkki siitä, ettei testiainetta sisältävä ruoka ole vielä kokonaan sulanut suolistossa. Tämä voidaan myös tarkistaa kokeellisesti irrottamalla suolisto ja analysoimalla se erikseen, jos kertymävaiheen päättyessä on otettu näytteeksi ylimääräisiä (kokonaisia) kaloja ja ne varastoitu. Jos poistumavaiheen lineaariseen regressioon sovellettu tilastollisesti pätevä poikkeamatesti osoittaa, että poistumavaiheen ensimmäisen näytteenottopisteen tulos on liian korkea, voi olla suositeltavaa soveltaa lineaarista regressiota k_2:n johtamisessa mutta jättää ensimmäinen poistumavaiheessa mitattu pitoisuus huomioimatta. Jos lineaariseen regressioon liittyvä epävarmuus vähenee huomattavasti ja on selvää, että poistumavaihe noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa, assimilaatiotehon laskennassa voi olla hyvä käyttää tuloksena saatuja arvoja $C_{0,d}$ ja k_2. Tämä on perusteltava kattavasti testiraportissa. On myös mahdollista, että poistumavaihe noudattaa muuta kuin ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos tämä on todennäköistä (eli luonnolliseksi logaritmiksi muunnetut tiedot näyttävät noudattavan käyrää verrattuna vaakasuoraan lineaariseen regressioon), k_2- ja $C_{0,d}$-arvojen laskutoimitukset eivät todennäköisesti päde ja olisi pyydettävä neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta.

Jos $C_{0,d}$ on hyvin paljon suurempi kuin mitattu arvo ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), se voi olla merkki jostakin seuraavista: aine on poistunut hyvin nopeasti (eli näytteenottopisteet ovat lähellä sovelletun analyysimenetelmän kvantifiointirajaa jo hyvin varhain poistumavaiheessa, ks. osa 6 jäljempänä), poistuma poikkeaa ensimmäisen asteen kinetiikasta, k_2:n ja $C_{0,d}$:n johtamisessa käytetty lineaarinen regressio on virheellinen tai mitatuissa pitoisuuksissa on ollut ongelmia joinakin näytteenottoajankohtina. Tällöin lineaarinen regressiokäyrä on tarkistettava osoittamalla näytteet, jotka ovat kvantifiointirajalla tai lähellä sitä, poikkeamat sekä käyrän selvä kaarevuus (jolloin voidaan olettaa, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde). Nämä asiat on myös mainittava testiraportissa. Jos lineaarinen regressio arvioidaan uudelleen arvoja koskevien arvioiden parantamiseksi, tämä toimenpide on kuvattava ja perusteltava. Jos havaitaan, että poikkeama ensimmäisen asteen kinetiikasta on merkittävä, lasketut k_2 ja $C_{0,d}$ eivät todennäköisesti päde ja on pyydettävä neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta.

6. OHJEITA TESTIAINEILLE, JOILLA POISTUMA ON HYVIN NOPEAA

Kuten tämän testimenetelmän 129 kohdassa todetaan, jotkut aineet poistuvat niin nopeasti, ettei nolla-ajankohdan pitoisuutta $C_{0,d}$ ja k_2-arvoa voida johtaa luotettavasti, koska testiainetta ei enää havaita (pitoisuudet ovat kvantifiointirajalla) poistumavaiheen varhaisessa vaiheessa otetuissa näytteissä (eli toisesta poistumavaiheen näytteestä alkaen). Tämän testimenetelmän tueksi tehdyssä yhteistutkimuksessa havaittiin, että bentso[a]pyreenilla tilanne oli tällainen. Tämä esitetään myös menetelmän validointiselosteessa. Tällöin lineaarista regressiota ei voida tehdä luotettavasti, koska se antaa todennäköisesti epärealistisen korkean arvion $C_{0,d}$-arvosta, jolloin assimilaatioteho näyttää olevan paljon suurempi kuin 1. Tällaisissa tapauksissa on mahdollista laskea k_2 ja BMF:n yläarvo suuntaa-antavasti.

Käyttämällä niitä poistumavaiheen datapisteitä, joissa pitoisuus mitattiin – mukaan lukien ensimmäinen piste, jossa pitoisuus oli ”ei-havaittava” (eli kvantifiointirajalla) $-k_2$ voidaan arvioida lineaarisen regression perusteella (käyttämällä luonnolliseksi logaritmiksi muunnettua pitoisuustietoa suhteutettuna aikaan). Tällaisissa tapauksissa kyseeseen tulee todennäköisesti vain kaksi datapistettä (esim. poistumavaiheen näytteenottopäivät 1 ja 2) ja k_2 voidaan sitten arvioida soveltamalla liitteessä 5 kuvattua yhtälöä A5.22. Arvioitua k_2-arvoa voidaan käyttää assimilaatiotehon arvioimiseksi yhtälön A7.1 mukaan korvaamalla $C_{0,d}$-arvo yhtälössä mitatulla nolla-ajankohdan pitoisuudella ($C_{0,m}$) tapauksissa, joissa $C_{0,d}$ on selvästi arvioitu suuremmaksi kuin mitä testissä olisi ollut mahdollista saavuttaa. Jos $C_{0,m}$-arvoa ei voitu mitata, pitäisi käyttää kalojen kudoksiin sovellettavaa havaitsemisrajaa. Jos joissakin tapauksissa saadaan tällöin tulokseksi $\alpha > 1$, assimilaatiotehon oletetaan ”pahimmassa tapauksessa” olevan 1.

Sitten voidaan arvioida suurin mahdollinen BMF_K käyttämällä yhtälöä A7.4, ja se pitäisi ilmoittaa ”paljon pienempi kuin” -arvona (<<). Jos tutkimuksen ruokkimistaajuus on 3 prosenttia, poistumavaiheen puoliintumisaika on vähemmän kuin kolme vuorokautta ja α on ”pahimmassa tapauksessa” 1, BMF_K on todennäköisesti alle 0,13. Kun otetaan huomioon tämän arvioinnin tarkoitus sekä se, että arvot ovat luonteeltaan suuntaa-antavia, niitä ei ole tarpeen korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen tai kalan ja ruoan rasvapitoisuuden mukaan.

Lisäys 8

LÄHESTYMISTAVAT ALUSTAVIEN BCF-ARVOJEN ARVIOIMISEKSI RAVINTOALTISTUSTESTISSÄ KERÄTTYJEN TIETOJEN PERUSTEELLA

Ravintoaltistusta käytetään osana tätä testimenetelmää sellaisten aineiden bioakkumulaation määrittämiseksi, joita ei voida käytännössä testata vesialtistusmenetelmällä. Vesialtistusmenetelmän avulla saadaan biokertyvyystekijä, kun taas ravintoaltistusmenetelmässä saadaan suoraan tietoa ravintoon liittyvästä biomagnifikaatiopotentiaalista. Monissa kemikaaliturvallisuutta koskevissa järjestelmissä edellytetään tietoa biokertyvyydestä vedessä (kuten riskiarvioinnissa ja kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä). Näin ollen ravintotutkimuksessa saatuja tietoja tarvitaan biokertyvyystekijän arvioimiseksi siten, että sitä voidaan verrata vesialtistusmenetelmän mukaan tehtyihin testeihin [1]. Tässä osassa käsitellään lähestymistapoja, jotka mahdollistavat edellä mainitun mutta tunnustavat arviointiin luontaisesti liittyvät puutteet.

Ravintotutkimuksessa mitataan poistuma poistumavakion k_2 määrittämiseksi. Jos kertymävakio voidaan arvioida saatavilla olevien tietojen perusteella silloin, kun kalat on altistettu testiaineelle veden välityksellä, voidaan arvioida myös kineettinen BCF.

Vesialtistuksessa testiaineen kertymävakiota koskeva arvio perustuu monilta osin olettamuksiin, jotka kaikki lisäävät arvion epävarmuustekijöitä. Kun tätä lähestymistapaa käytetään BCF:n arvioinnissa, oletuksena on, ettei yleinen poistumavakio (mukaan lukien siihen vaikuttavat tekijät, kuten leviäminen kehossa ja yksittäiset poistumisprosessit) ole riippuvainen altistustekniikasta, jota on käytetty testiaineen kertymän osoittamisessa.

Arvioihin perustuvan lähestymistavan pääolettamat voidaan tiivistää seuraavassa esitetyllä tavalla.

Ravintoaltistuksen kertymävaihetta seuraava poistuma noudattaa tietyllä aineella samaa kaavaa kuin vesialtistuksessa.

Vedestä saatava kertymä noudattaa mahdollisesti ensimmäisen asteen kinetiikkaa.

Kertymän arvioinnissa sovelletusta menetelmästä riippuen

— kertymä voi korreloida ainoastaan kalojen painon kanssa

— kertymä voi korreloida ainoastaan kyseessä olevan aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen kanssa

— kertymä voi korreloida sekä kalojen painon että kyseisen aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen kanssa

— tekijät, jotka käytännössä vaikuttavat kertymään vesialtistustutkimuksessa, kuten aineen biologinen hyötyosuus, absorboituminen laitteistoon, molekyylikoko ja niin edelleen, vaikuttavat vain vähän

— ja ratkaisevaa on, että

kertymän arviointimenetelmän kehittämisessä käytetty tietokanta (”harjoitussarja”) antaa edustavan kuvan tutkimuksen kohteena olevasta aineesta.

Useissa kaikille avoimesta kirjallisuudesta löytyvissä julkaisuissa esitellään johdettuja yhtälöitä, joissa liitetään veden välityksellä tapahtuva kertymä kalan kiduksissa aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimeen, kalojen painoon (1) (2) (3) (4), määrään ja/tai rasvapitoisuuteen, limakalvojen läpäisevyyteen/diffuusioon niiden kautta (5) (6), kalojen ilmanvaihtovolyymiin (7) fugasiteettiin tai massaan perustuvassa lähestymistavassa (8) (9) (10). Kyseisten menetelmien käyttöä tässä yhteydessä arvioidaan yksityiskohtaisesti Crookesin & Brooken teoksessa (11). Barberin julkaisu (12), jossa käsitellään bioakkumulaation mallintamista ravinnon välityksellä tapahtuvassa kertymässä, on myös hyödyllinen tässä yhteydessä, koska siinä esitellään kudosten kautta tapahtuvaa kertymää koskevia malleja. Vuonna 2014 julkaistun ravintoprotokollan (13) tausta-asiakirjassa yksi osa oli myös varattu kokonaan tämän näkökulman käsittelyyn.

[1] Luonnossa suurin mahdollinen altistus vesiympäristössä tapahtuu todennäköisesti imeytymisen kautta hyvin hydrofobisilla aineilla. Näin ollen arvioitu BCF ei kuvaa täysin tarkasti tällaisen aineen biokertyvyyspotentiaalia.

Useimmat näistä malleista on ilmeisesti johdettu käyttäen apuna rajallisia tietokantoja. Sellaisten mallien osalta, joiden muodostamisessa käytettyjen tietokantojen tarkat tiedot ovat saatavilla, näyttää siltä, että käytettyjen ainetyyppien rakenne ja luokitus ovat usein samankaltaisia (esim. toimivuuden kannalta, kuten orgaanisilla klooreilla). Tämä lisää epävarmuutta silloin, kun käytetään jotakin mallia tyypiltään erilaisen aineen kertymävakion ennustamisessa testikohtaisten piirteiden, kuten muun muassa lajien ja lämpötilan, ohella.

Käytössä olevien tekniikoiden tarkastuksen yhteydessä (11) kävi ilmi, ettei mikään menetelmä ole muita "oikeampi". Näin ollen valittu malli on perusteltava selkeästi. Jos tarjolla on useita menetelmiä, joiden käyttö on perusteltavissa, kannattaa mahdollisesti esittää useita arvioita k_1-arvosta (ja BCF:stä) tai k_1-arvojen (ja BCF:n) vaihteluväli useiden kertymään sovellettavien arviointimenetelmien mukaisesti. Koska mallien tyypit ja niissä käytetyt tietosarjat eroavat toisistaan, eri tavalla johdettujen arvioiden keskiarvoa ei ole tarkoituksenmukaista käyttää.

Jotkut tutkijat ovat esittäneet, että tämän kaltaiset BCF-arviot on korjattava biologisen hyötyosuuden perusteella, jotta voidaan ottaa huomioon aineen absorboituminen liuenneeseen orgaaniseen hiileen (DOC) vesialtistuksessa. Näin arvio voidaan mukauttaa vesialtistustutkimusten tuloksiin (esim. (13) (14)). Tämä korjaus ei kuitenkaan aina ole tarkoituksenmukaista, koska vesialtistustutkimuksessa tarvittavan orgaanisen hiilen taso "pahimmassa tapauksessa" -arviota varten on niin alhainen (biologisesti hyödynnettävän aineen osuus suhteessa liuoksessa mitattuun aineeseen). Erittäin hydrofobisilla aineilla kudosten pinnan lähellä tapahtuvan passiivisen diffuusion taso saattaa rajoittaa kudosten kautta tapahtuvaa kertymää. Tällöin on mahdollista, että korjaus on oleellisempaa tämän vaikutuksen kannalta kuin sen vaikutuksen kannalta, jota varten se on alun perin suunniteltu.

On suositeltavaa keskittyä menetelmiin, jotka edellyttävät syötteitä, joille on jo saatavissa tietoa tässä kuvatun ravintotutkimuksen mukaisesti testattavista aineista (kuten log K_{OW}, kalojen paino). Monimutkaisempia syötteitä edellyttäviä menetelmiä voidaan myös soveltaa, mutta niissä on mahdollisesti tehtävä testin aikana suurempi määrä mittauksia tai niissä tarvitaan sellaista yksityiskohtaista tietoa testiaineesta tai kalalajista, joka ei ole vielä yleisesti saatavilla. Lisäksi mallin valinnassa saattavat vaikuttaa sen validointitaso ja soveltamisala (ks. (11) eri menetelmien tarkistamisesta ja vertailusta).

On pidettävä mielessä, että saatava k_1-arvio sekä arvioitu BCF ovat epävarmoja ja ne on arvioitava todistusnäyttöön perustuvan lähestymistavan sekä johdetun BMF:n ja aineen muuttujien (kuten molekyylikoko) perusteella, jotta saataisiin kokonaiskuva kyseisen aineen bioakkumulaatiopotentiaalista. Näiden muuttujien tulkinta ja käyttö saattavat riippua sovellettavasta säädöskehyksestä.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1–14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325–341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963–1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304–315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699–707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399–1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577–583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337–345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755–777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189–231."

17) Korvataan C osassa oleva C.20 luku seuraavasti:

"C.20 **Lisääntymistesti vesikirpulla (*Daphnia magna*)**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 211 (2012). OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteen kehityksen perusteella. Lisääntymistestin yleisohje 211 on peräisin testiohjeen 202 II osasta, *Daphnia*-lajin vesikirppujen lisääntymistesti (*Daphnia* sp. reproduction test) (1984) On yleisesti tunnustettu, että tiedot testeistä, jotka tehtiin testiohjeen 202 perusteella, voivat olla vaihtelevia. Siksi pyrittiin panostamaan huomattavasti tämän vaihtelun syiden tunnistamiseen. Tavoitteena oli saada aikaan parempi testimenetelmä. Testiohje 211 perustuu näiden tutkimusten, yhteistutkimusten ja vuonna 1992 (1), 1994 (2) ja 2008 (3) tehtyjen validointitutkimusten tuloksiin.

Lisääntymistestin ohjeen alkuperäisen version (testiohje 202, 1984) ja toisen version (testiohje 211, 1988) väliset pääasialliset erot ovat seuraavat:

— Laji, jota suositellaan käytettäväksi on *Daphnia magna*.

— Testin kesto on 21 vuorokautta.

— Semistaattisessa testissä kussakin testikonsentraatiossa käytettävän vähintään 40 eläimen määrää on vähennetty, ja ne jaetaan mieluiten neljään 10 eläimen ryhmään, joista ainakin 10 eläintä pidetään yksittäin (vaikka läpivirtaustesteissä voidaan käyttää eri malleja).

— Viljelynesteestä ja ruokinnasta on annettu tarkempia suosituksia.

— Pääasialliset erot lisääntymistestin ohjeen toisen version (TG 211, 1998) ja tämän version välillä ovat seuraavat:

— Lisäys 7 on lisätty kuvaamaan menettelyitä vastasyntyneen sukupuolen tunnistamiseen, jos tätä tarvitaan. Tämän testimenetelmän aikaisempien versioiden mukaisesti sukupuolten välinen suhde on valinnainen päätepiste.

— Elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten vastemuuttujien määrää on täydennetty ylimääräisellä vesikirpun lisääntymistä koskevalla vastemuuttujalla – testin lopussa tuotettujen elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin alussa ollutta emovesikirppua kohti – ja analyysin ulkopuolelle jätetään emon vahingossa ja/tai epähuomiossa tapahtunut kuolema. Uuden vastemuuttujan tarkoitus on tämän vastemuuttujan mukauttaminen selkärankaisten lisääntymiseen liittyviin muihin testimenetelmiin. Lisäksi, kun kyse on tästä vastemuuttujasta, tässä testimenetelmässä on mahdollista poistaa virhelähde, eli emon epähuomiossa ja/tai vahingossa tapahtuva kuolema, jos tämä sattuu altistuksen aikana.

— Muita tilastollisia ohjeita testin suunnitteluun ja tulosten käsittelyyn on sisällytetty ECx-arvoa (esimerkiksi EC50, EC10) ja NOEC/LOEC-arvoa koskevaan lähestymistapaan.

— Lisäksi otetaan käyttöön raja-annostesti.

Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

Testin pääasiallinen tarkoitus on määrittää kemikaalien vaikutus *Daphnia magna*-vesikirpun lisääntymistuotokseen. Tästä syystä nuoria naarasvesikirppuja (emot), joiden ikä on alle 24 tuntia testin alussa, altistetaan testikemikaalille, jota on lisätty veteen useissa pitoisuuksissa. Testin kesto on 21 vuorokautta. Testin lopussa arvioidaan elävien jälkeläisten kokonaismäärä. Emojen lisääntymistuotos voidaan ilmaista muillakin tavoin (esim. elävien jälkeläisten määrä eläintä kohti päivässä siitä päivästä lähtien, jolloin jälkeläiset havaittiin ensimmäisen kerran), mutta tämä pitäisi ilmoittaa testin lopussa tuotettujen elävien jälkeläisten kokonaismäärän lisäksi. Koska puolistaattisella testillä on erityinen rakenne muihin selkärangattomien lisääntymistä koskeviin testimenetelmiin verrattuna, on myös mahdollista laskea kunkin yksittäisen emon elävien jälkeläisten määrä. Tämä mahdollistaa, toisin kuin muissa selkärangattomien lisääntymistä koskevissa testimenetelmissä, että jos emoeläin kuolee vahingossa ja/tai epähuomiossa testijakson aikana, sen jälkeläisten tuotanto voidaan jättää pois tietojen arvioinnista. Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisnäytteitä ei pitäisi jättää arvioinnin ulkopuolelle. Jos emo kuolee testin aikana, joko vahingossa epäasianmukaisen käsittelyn tai tapaturman vuoksi tai epähuomiossa selittämättömän tapauksen vuoksi, joka ei liity testikemikaalin vaikutukseen, tai jos kyseessä on koiras, rinnakkainen eläin jätetään arvioinnin ulkopuolelle (lisätietoja on 51 kohdassa). Testikemikaalin toksinen vaikutus lisääntymistuotokseen ilmaistaan EXc-arvolla sovittamalla tiedot sopivaan malliin epälineaarisella regressiomenetelmällä, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaisi x prosentin vähennyksen lisääntymistuotoksiin, tai vaihtoehtoisesti NOEC/LOEC-arvolla (4). *Testipitoisuudeksi olisi valittava alhaisin käytetyistä vaikuttavista pitoisuuksista (esim. EC_{10}), mikä merkitsee, että tämä arvo lasketaan ekstrapoloinnin sijaan interpoloimalla.*

Myös emojen eloonjääminen ja ensimmäisten sikiöiden tuottamisen ajankohta on ilmoitettava. Muut kemikaaliin liittyvät vaikutukset muuttujiin, kuten kasvu (esim. pituus), ja mahdollisesti populaation kasvun ominaisnopeus voidaan myös tutkia (ks. 44 kohta).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

Akuuttia toksisuutta koskevan tutkimuksen tulokset (ks. tässä liitteessä oleva C.2 luku: *Daphnia* sp. akuutin immobilisaation testi), joka tehdään *Daphnia magna* -vesikirpuille voi olla hyödyllinen valittaessa lisääntymistestien sopivat testipitoisuusalueet. Testikemikaalin vesiliukoisuus ja höyrynpaine on oltava tiedossa, ja kemikaalin kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka saantoteho on raportoitu, ja määritysraja pitäisi olla saatavissa.

Testikemikaalia koskevia tietoja, joista on hyötyä testiolosuhteiden määrittelemiseksi, ovat mm. rakennekaava, kemikaalin puhtaus, valostabiilisuus, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin tulokset (ks. tässä liitteessä oleva C.4 luku [biohajoavuuden määritys] ja C.29 luku [helpon biohajoavuuden testi – hiilidioksidi suljetuissa astioissa]).

TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi luotettava, kontrollien pitäisi täyttää seuraavat perusteet:

— Emojen (naarasvesikirppujen) kuolleisuus on enintään 20 prosenttia testin lopussa.

— Testin lopussa elossa olevan emon tuottamia eläviä jälkeläisiä on keskimäärin vähintään 60.

Huomautus: samaa hyväksyttävyysperustetta (20 prosenttia) voidaan soveltaa emon vahingossa ja/tai epähuomiossa tapahtuvaan kuolemaan kontrolleissa sekä kutakin testipitoisuutta kohti.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia dekantterilaseja.

Lisäksi tarvitaan seuraavia välineitä (kaikkia tai joitakin niistä):

— happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä)

— asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön

— ph-mittari

— laitteet veden kovuuden mittaamiseen

— laitteet veden orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen

— asianmukaiset laitteet valojärjestelmän ja valon intensiteetin säätöön.

Koe-eliö

Testissä olisi käytettävä *Daphnia magna Straus* -eliötä ([1]).

Klooni olisi mieluiten tunnistettava genotyypin määrityksellä. Tutkimuksissa (1) on osoitettu, että kloonin A (joka on peräisin IRCHA:sta Ranskasta) (5) lisääntymistuottavuus täyttää jatkuvasti vaatimuksen, jonka mukaan tässä testimenetelmässä kuvatuissa olosuhteissa tuotto on keskimäärin ≥ 60 jälkeläistä kutakin elävää emoa kohti. Muutkin kloonit ovat kuitenkin hyväksyttäviä, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

([1]) Muita vesikirppuja saa käyttää, jos ne täyttävät asianmukaiset vaatimukset (kontrollien lisääntymistuottavuutta koskevan perustet pitäisi olla kaikille lajeille merkityksellinen). Jos muita vesikirppuja käytetään, ne olisi selkeästi tunnistettava ja niiden käyttö olisi perusteltava.

Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, eivätkä ne saa olla ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä, kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneste, ravinto ja eläinten määrä tilavuusyksikköä kohti) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneste eroaa vesikirpun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelynesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä noin kolmen viikon ajan (ts. yhden sukupolven ajan), jotta emojen stressaantuminen vältettäisiin.

Testiviljelyaine

Testiin suositellaan täysin määriteltyä viljelynestettä. Siten voidaan välttää sellaisten lisäaineiden (esim. levät, maaperäuute) käyttö, joiden ominaisuuksia ei voida hallita täydellisesti, ja parannetaan siten mahdollisuuksia laboratorioiden väliseen vakiointiin. Elendtin M4- (6) ja M7-viljelynesteet (ks. lisäys 2) on todettu sopiviksi tähän tarkoitukseen. Muitakin viljelynesteitä (esim. (7) (8)) voidaan käyttää, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Jos käytetään viljelynesteitä, joissa on kemiallisesti määrittelemättömiä lisäaineita, lisäaineet on spesifioitava selvästi ja testiselosteessa on annettava tietoa niiden koostumuksesta, erityisesti hiilipitoisuudesta, koska se voi vaikuttaa annettavaan ravintoon. Suositellaan, että orgaanisen lisäaineen varastovalmisteen orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja/tai kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään ja valmisteen vaikutus testissä käytettävän viljelynesteen TOC- ja/tai COD-arvoihin arvioidaan. Viljelynesteen TOC-tason olisi oltava (ennen levien lisäämistä) alle 2 mg/l (9).

Kun testataan metalleja sisältäviä kemikaaleja, on tärkeää ottaa huomioon, että testissä käytettävän viljelynesteen ominaisuudet (esim. kovuus, kelaatiokyky) voivat vaikuttaa testikemikaalien toksisuuteen. Tästä syystä on toivottavaa käyttää kemiallisesti määriteltyä viljelynestettä. Tällä hetkellä kuitenkin ainoat kemiallisesti määritellyt viljelynesteet, joiden tiedetään sopivan *Daphnia magnan* pitkäaikaiseen viljelyyn, ovat Elendtin M4 ja M7. Molemmissa viljelynesteissä on kelatoivaa ainetta EDTA:ta. On osoitettu (2), että kadmiumin ”näennäinen toksisuus” on yleensä pienempi, kun testi tehdään M4- ja M7-viljelynestcessä kuin nesteessä, joka ei sisällä EDTA:ta. M4- ja M7-viljelynesteitä ei siksi suositella metalleja sisältävien kemikaalien testaukseen, ja myös muita viljelynesteitä, joissa on tunnettuja kelatoivia aineita, olisi vältettävä. Metalleja sisältäville kemikaaleille voi olla suositeltavaa käyttää jotain muuta viljelynestettä, esimerkiksi ASTM:n rekonstituoitua kovaa makeaa vettä (9), joka ei sisällä EDTA:ta. Tämä ASTM:n kovan makean veden ja leväuutteen yhdistelmä (10) sopii myös Daphnia magna -vesikirpun pitkäaikaiseen viljelyyn (2).

Testin alussa ja sen aikana liuenneen hapen pitoisuuden olisi oltava yli 3 mg/l, ja pH:n olisi oltava välillä 6–9, eikä se saisi yleensä vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä testin aikana. Kovuudeksi suositellaan yli 140 mg/l (ilmaistuna $CaCO_3$:na). Tällä ja suuremmalla pitoisuudella tehdyissä testeissä on osoitettu validiteettiperusteiden mukaista lisääntymistuottavuutta (11) (12).

Testiliuokset

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti kantaliuoksista laimentamalla. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten ilman liuottimia tai dispergointiaineita sekoittamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittaminen tai ultraääni) tai muita asianmukaisia menetelmiä käyttäen. On suositeltavaa, että testijärjestelmiä altistetaan tutkimukseen käytettävän testikemikaalin pitoisuudelle niin kauan kuin se on tarpeen, jotta vakaiden altistuspitoisuuksien ylläpitäminen osoitetaan ennen testiorganismien käyttöönottoa. Jos testikemikaalia on vaikea liuottaa veteen, olisi noudatettava menettelyitä, joita kuvataan OECD:n ohjeissa vaikeasti testattavista aineista (13). Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä pitäisi välttää, mutta tämä voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi annostelua varten.

Testisarjojen lisäksi on tehtävä laimennusvesikontrolli, johon liittyvät riittävät rinnakkaisnäytteet, ja jos on välttämätöntä, liuotinkontrolliviljelmä, johon liittyvät riittävät rinnakkaisnäytteet. Testissä on käytettävä ainoastaan liuottimia tai dispergointiaineita, joilla ei ole tutkimusten perusteella merkittävää vaikutusta vastemuuttujaan tai joilla on ainoastaan vähäinen vaikutus. Esimerkkejä sopivista liuottimista (esim. asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli) ja dispergointiaineista (esim. Cremophor RH40, 0,01-prosenttinen metyylisellulloosa ja HCO-40) annetaan viitteessä (13). Jos käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, sen pitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l (13) ja pitoisuuden on oltava sama kaikissa testiastioissa paitsi laimennusvesikontrollissa. On kuitenkin kaikin keinoin pidettävä liuottimen pitoisuutta minimissä.

MENETTELY

Altistusolosuhteet

Kesto

Testin kesto on 21 vuorokautta.

Täyttö

Emoja pidetään testiastiassa yksi eläin astiaa kohti, astiaan pannaan yleensä 50–100 ml viljelynestettä (kun kyseessä on *Daphnia magna,* pienemmille vesikirpuille, esim. *Ceriodaphnia dubia* -lajille voidaan mahdollisesti käyttää pienempiä vesimääriä), ellei testiin tarvita läpivirtaustestiä.

Suurempi tilavuus voi olla joskus tarpeen testikemikaalin pitoisuuden määritykseen käytettävän analyyttisen menetelmän vaatimusten vuoksi, vaikka rinnakkaisnäytteet voidaan myös yhdistää kemiallista analyysiä varten. Jos tilavuus on yli 100 ml, vesikirpulle annettavaa annosta on ehkä suurennettava, jotta varmistetaan ravinnon riittävyys ja validiteettiperusteiden noudattaminen.

Koe-eläimet

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä on oltava vähintään 10 yksittäin kasvatettua vesikirppua kutakin testipitoisuutta kohti ja vähintään 10 yksittäin pidettyä vesikirppua kontrollisarjassa.

Läpivirtaustesteissä 40 vesikirppua neljään 10 vesikirpun ryhmään jaettuna on osoittautunut sopivaksi (1). Pienempääkin määrää eläimiä voi käyttää. Suositellaan vähintään 20:tä vesikirppua pitoisuutta kohti jaettuna kahdeksi tai useammaksi yhtä monta vesikirppua käsittäväksi rinnakkaisnäytteeksi (esim. neljä rinnakkaista, joista kussakin viisi vesikirppua). On pantava merkille, että testeissä, joissa eläimiä pidetään ryhmissä, mitään jälkeläistä ei voida jättää tilastollisen analyysin ulkopuolelle, jos emo kuolee epähuomiossa/vahingossa lisääntymisen alettua, ja siksi näissä tapauksissa lisääntymistuotos olisi ilmaistava elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin alussa mukana olevia emoja kohti.

Testiaineet jaetaan testiastioihin, joita on tämän jälkeen käsiteltävä satunnaistetusti. Jollei satunnaisteta, tästä saattaa aiheutua systemaattinen virhe, joka voidaan tulkita pitoisuudesta aiheutuvaksi vaikutukseksi. Erityisesti jos koeastioita käsitellään annostelu- tai pitoisuusjärjestyksessä, jokin aikaan liittyvä tekijä, kuten työntekijän väsymys tai muu virhe, saattaa aiheuttaa voimakkaampia vaikutuksia suuremmilla pitoisuuksilla. Jos lisäksi olosuhteet testin alussa tai ympäristöolosuhteet, kuten sijoituspaikka laboratoriossa, saattavat vaikuttaa testituloksiin, olisi harkittava testin eristämistä.

Ruokinta

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä vesikirppuja olisi ruokittava mieluiten joka päivä mutta ainakin kolmesti viikossa (ts. silloin kun viljelyneste vaihdetaan). Altistuspitoisuuksien mahdollinen laimentaminen ravinnon lisäämisellä on otettava huomioon ja sitä on vältettävä mahdollisimman paljon konsentroidussa leväsuspensioissa. Jos tästä poiketaan (esim. läpivirtaustestissä), siitä olisi ilmoitettava.

Testin aikana emojen ruokavalion pitäisi koostua mieluiten seuraavien lajien (yhden tai useamman) elävistä levistä: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (aikaisemmin *Selenastrum capricornutum*) ja *Desmodesmus subspicatus* (aikaisemmin *Scenedesmus subspicatus*). Ruokavalion pitäisi perustua siihen orgaanisen hiilen (C) määrään, joka on annettava kullekin emolle. Tutkimuksissa (14) on osoitettu, että annokset 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vrk riittävät vesikirpulla siihen, että eläviä jälkeläisiä saadaan riittävä määrä, jotta testin validiteettiperusteet täyttyvät. Ravintoannos voidaan annostella joko vakionopeudella koko testin ajan tai haluttaessa voidaan alussa käyttää alhaisempaa nopeutta, jota lisätään testin aikana emojen kasvun huomioon ottamiseksi. Tällöinkin annoksen on pysyttävä samana suositellulla alueella 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vuorokausi koko testin ajan.

Jos käytetään muita menetelmiä (kuten leväsolujen määrä tai valon absorptio) vaaditun ravintoannoksen määrittämiseksi esimerkiksi siksi, että hiilipitoisuuden määritys on aikaa vievää, laboratorioiden on laadittava omat nomogramminsa, joista saadaan leväviljelmän hiilipitoisuus (ks. lisäys 3, ohjeet nomogrammien laatimiseksi). Nomogrammit olisi tarkistettava vähintään kerran vuodessa ja useamminkin, jos levien viljelyolosuhteet muuttuvat. On havaittu että valon absorptio on parempi menetelmä hiilipitoisuuden määrittämiseksi kuin solumäärä (15).

Vesikirpulle olisi annettava ravinnoksi konsentroitua leväsuspensiota, jotta testiastioihin lisätyn levänviljelynesteen tilavuus olisi mahdollisimman pieni. Konsentroitu levä saadaan aikaan sentrifugoimalla, jota seuraa suspendointi uudelleen vesikirppuviljelmän viljelynesteessä.

Valo

16 tuntia valoa, jonka intensiteetti on enintään 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ mitattuna astian veden pinnasta. (Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, suositeltu valonvoimakkuus 15–20 µE·m–2·s–1 vastaa suunnilleen kylmänvalkoisen valon voimakkuusaluetta 1 000–1 500 lux.)

Lämpötila

Testissä käytettävän viljelynesteen lämpötilan on oltava 18–22 °C. Lämpötila ei saisi kuitenkaan, jos mahdollista, vaihdella missään testissä enempää kuin 2 °C kyseisissä rajoissa (esim. 18–20, 19–21 tai 20–22 °C) vuorokauden vaihteluvälinä. Lämpötilan seuraamista varten voi olla tarpeen lisätä yksi testiastia.

Ilmastus

Testiastioita ei saa ilmastaa testin aikana.

Testijärjestely

Raja-annostesti

Tarvittaessa pitoisuusalueen määritystesti toteutetaan esimerkiksi siten, että siinä on viisi testikemikaalipitoisuutta ja kaksi rinnakkaisnäytettä kutakin altistusta ja kontrollia kohti. Lisätiedot testeistä, joissa käytetään samankaltaisia kemikaaleja tai kirjallisuus välittömästä toksisuudesta vesikirpuille ja/tai muille vesieliöille, voivat olla hyödyllisiä päätettäessä pitoisuusalueen määritystestissä käytettävästä konsentraatioalueesta.

Pitoisuusalueen määritystestin kesto on 21 päivää tai riittävä kesto vaikutustasojen luotettavaan ennustamiseen. Testin lopussa arvioidaan vesikirppujen lisääntyneisyys. Vanhempien määrä ja jälkeläisten esiintyminen olisi kirjattava.

Varsinainen testi

Normaalisti pitäisi olla vähintään viisi testipitoisuutta, joissa haarukoidaan vaikuttava pitoisuus (esim. EC_x) ja jotka on järjestetty geometriseen sarjaan, jonka suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2. Kutakin testipitoisuutta kohden olisi tehtävä asianmukainen määrä rinnakkaisnäytteitä (ks. 24–25 kohta). Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Kemikaaleja ei saisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmassa pitoisuudessa. Ennen kokeen tekemistä on suositeltavaa harkita testimallin tilastollista voimaa ja käyttää asianmukaisia tilastollisia menetelmiä (4). Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

i) jos arvioidaan EC_x lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että käytetään niin suurta määrää pitoisuuksia, että EC_x voidaan määrittää asianmukaisella luotettavuustasolla. Käytetyissä testipitoisuuksissa pitäisi mieluiten haarukoida arvioitu EC_x siten, että EC_x löydetään interpoloimalla ekstrapoloinnin sijaan. Seuraavan tilastollisen analyysin etuna on suurempi määrä testipitoisuuksia (esim. 10) ja pienempi määrä rinnakkaisnäytteitä kustakin pitoisuudesta (esim. 5, joten astioiden kokonaismäärä pidetään vakiona) ja 10 kontrollia;

ii) kun määritetään LOEC ja/tai NOEC, testin pienimmän pitoisuuden on oltava niin pieni, ettei lisääntymistuotos tällä pitoisuudella ole merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava vielä pienemmällä pitoisuudella;

iii) kun määritetään LOEC ja/tai NOEC, testin suurimman pitoisuuden on oltava niin suuri, että lisääntymistuotos tällä pitoisuudella on merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Jos näin ei ole, testi on toistettava lisäämällä suurinta pitoisuutta, ellei suurinta edellytettyä testin pitoisuutta kroonisten vaikutusten testaukseen (eli 10 mg/l) ole käytetty testin suurimpana pitoisuutena alkutestissä.

Jos mitään vaikutuksia ei havaita suurimmassa pitoisuudessa pitoisuusalueen määritystestissä (esim. 10 mg/l) tai jos testikemikaalilla on erittäin todennäköinen alhainen toksisuusvaikutus/ei ole toksisuusvaikutusta perustuen siihen, ettei muille eliöille aiheuteta toksisuusvaikutusta, ja/tai alhainen ottotaso tai ei ollenkaan ottotasoa, lisääntymistesti voidaan tehdä raja-annostestinä käyttäen testipitoisuutena esim. 10 mg/l ja kontrollia. Altistus- ja kontrolliryhmien osalta olisi tehtävä kymmenen rinnakkaisnäytettä. Jos raja-annostesti tehdään läpivirtausjärjestelmässä, vähempi määrä rinnakkaisnäytteitä riittää. Raja-annostesti antaa mahdollisuuden osoittaa, ettei rajapitoisuudessa ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta, mutta jos vaikutukset kirjataan, tavanomaisesti vaaditaan koko testin tekemistä.

Kontrollit

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi viljelynestettä sisältävä kontrollisarja ja tapauksen mukaan yksi liuotinta tai dispergointiainetta sisältävä kontrollisarja. Mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testikemikaalia sisältävissä testiastioissa. Riittävä määrä rinnakkaisnäytteitä olisi määritettävä (ks. 23–24 kohta).

Yleensä hyvin suoritetussa testissä kontrollinäytteissä emojen tuottamien elävien jälkeläisten määrän keskiarvon vaihtelukerroin saisi olla ≤ 25 %, ja tämä olisi ilmoitettava testimalleista, joissa käytetään yksittäin kasvatettuja eläimiä.

Testissä käytettävän viljelynesteen vaihto

Viljelynesteen vaihtoväli riippuu testikemikaalin stabiiliuudesta ja se pitäisi vaihtaa vähintään kolme kertaa viikossa. Jos testikemikaalin pitoisuus alustavien testien perusteella (ks. 7 kohta) ei ole stabiili (ts. ei ole välillä 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta tai laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) pisimmän hyväksytyn vaihtovälin aikana (ts. 3 vrk), olisi harkittava viljelynesteen vaihtamista useammin tai siirtymistä läpivirtaustestiin.

Kun viljelyneste vaihdetaan puolistaattisessa testissä, valmistetaan toinen sarja testiastioita ja emovesikirput siirretään niihin esim. sopivan kokoisella lasipipetillä. Vesikirpun kanssa siirrettävän viljelynesteen tilavuuden pitäisi olla mahdollisimman pieni.

Havainnot

Testin aikana tehtyjen havaintojen tulokset olisi kirjattava testilomakkeille (ks. lisäyksen 4 ja 5 esimerkit). Jos on tehtävä muita mittauksia (ks. 44 kohta), on ehkä tehtävä lisähavaintoja.

Jälkeläiset

Kunkin emon tuottamat jälkeläiset olisi mieluiten otettava astiasta ja laskettava päivittäin ensimmäisistä jälkeläisistä lähtien, jotta ne eivät söisi emoille tarkoitettua ravintoa. Tässä testimenetelmässä tarvitsee laskea vain elävät jälkeläiset, mutta kuolleiden munien tai poikasten esiintyminen olisi kirjattava.

Kuolleisuus

Emojen kuolleisuus olisi kirjattava mieluiten päivittäin tai ainakin yhtä usein, kun poikaset lasketaan.

Muut parametrit

Vaikka tämän testimenetelmän pääasiallisena tarkoituksena on lisääntymistuotosten arviointi, on mahdollista, että muitakin vaikutuksia esiintyy siinä määrin, että ne voidaan analysoida tilastollisesti. Lisääntymistuotos elossa olevaa eläintä kohti eli testin aikana tuotettujen elävien jälkeläisten lukumäärä elossa olevaa emoa kohti, voidaan kirjata. Tätä voidaan verrata tärkeimpään vastemuuttujaan (lisääntymistuotos emoa kohti testin alkaessa, joka ei kuole epähuomiossa tai vahingossa testin aikana). Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisnäytteitä ei pitäisi jättää testituloksen arvioinnin ulkopuolelle. Kasvumittaukset ovat hyvin toivottavia, koska niistä saa mahdollisia subletaaleja vaikutuksia koskevia tietoja, jotka voivat olla hyödyllisiä lisääntymisen määrittämisen lisäksi. Emojen pituuden (ts. pituus ilman pyrstörankaa) mittausta testin lopussa suositellaan. Muita muuttujia, jotka voidaan mitata tai laskea, ovat aika ensimmäisten sikiöiden (ja myöhempien sikiöiden) tuottamiseksi, sikiöiden määrä ja koko eläintä kohti, abortoitujen sikiöiden määrä, vastasyntyneiden koiraiden esiintyvyys (OECD, 2008) tai lepomunat ja mahdollisesti populaation kasvun ominaisnopeus (määritelmistä on tietoja liitteessä 1 ja vastasyntyneiden sukupuolen tunnistamisesta liitteessä 7).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

Happipitoisuus, lämpötila, veden kovuus ja pH-arvot olisi mitattava vähintään kerran viikossa sekä tuoreesta että vanhasta viljelynesteestä, kontrolleista ja testistä, jossa on suurin testikemikaalin pitoisuus.

Testin aikana testikemikaalin pitoisuus määritetään säännöllisin väliajoin.

Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testikemikaalin pitoisuuden odotetaan pysyvän ± 20 prosentissa (ts. välillä 80–120 prosenttia) nimellispitoisuudesta (ks. 6, 7 ja 39 kohta), suurimmat ja pienimmät testissä käytetyt pitoisuudet määritetään tuoreista testiliuoksista ja viljelynestettä vaihdettaessa kerran ensimmäisen testiviikon aikana (ts. määritys olisi tehtävä samasta liuoksesta, kun se on tuore ja kun se vaihdetaan). Nämä määritykset olisi tehtävä tämän jälkeen uudelleen vähintään viikon välein.

Testeissä, joissa testikemikaalin pitoisuuden ei odoteta pysyvän ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta, on välttämätöntä määrittää testipitoisuudet sekä tuoreesta liuoksesta että liuosta vaihdettaessa. Kuitenkin jos mitattu testikemikaalin alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta jos on riittävästi näyttöä siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä viikolla 2 ja 3 ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Joka tapauksessa testiaineen pitoisuus tarvitsee määrittää liuosta vaihdettaessa vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle.

Jos kyseessä on läpivirtaustesti, samanlainen näytteenotto-ohjelma on sopiva kuin puolistaattisissa testeissä (vaikka ”vanhasta” liuoksesta ei tehdä määritystä). Voi kuitenkin olla suositeltavaa lisätä näytteenottoajankohtia ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme määrityssarjaa) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet muuttumattomina. Tällaisissa testeissä laimentimen ja testikemikaalin virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan kemikaalin pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin. Jos poikkeama nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta on suurempi kuin ± 20 prosenttia, tulokset olisi ilmaistava aikapainotettuna keskiarvona (ohjeet laskentaan ks. lisäys 6).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset lisääntymistuotoksiin. Elävien jälkeläisten kokonaismäärä emojen määrää kohti olisi laskettava jokaiselle testiastialle (ts. rinnakkaisnäytteille). Lisäksi lisääntyminen voidaan laskea elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten tuotannon perusteella. Kuitenkin ekologisesti merkittävin vastemuuttuja on elävien jälkeläisten kokonaismäärä emoa kohti, joka ei kuole vahingossa ([1]) tai epähuomiossa ([2]) testin aikana. Jos jossakin rinnakkaisnäytteessä emo kuolee vahingossa tai epähuomiossa testin aikana tai osoittautuu koiraaksi, kyseinen rinnakkaisnäyte jätetään testin ulkopuolelle. Analyysi perustuu silloin pienempään määrään rinnakkaisnäytteitä. Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisia eläimiä ei pitäisi jättää testituloksen arvioinnin ulkopuolelle.

Yhteenvetona, kun LOEC/NOEC-arvoa tai EC_x-arvoa käytetään ilmaisemaan vaikutuksia, on suositeltavaa laskea lisääntymisen vaikutus käyttämällä kumpaakin edellä mainittua vastemuuttujaa, eli

— elävien jälkeläisten kokonaismäärää sellaista emoa kohden, joka ei kuole vahingossa tai epähuomiossa testin aikana, ja

— elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten määrää

ja sen jälkeen käyttää lopullisena tuloksena alhaisinta LOEC/NOEC-arvoa tai EC_x-arvoa, joka lasketaan käyttämällä jompaakumpaa näistä kahdesta vastemuuttujasta.

Ennen tilastollisen analyysin käyttöä, esim. ANOVA-menettelyt, käsittelyiden vertaaminen kontrolliin Student t-testillä, Dunnettin testillä, tai alaspäin askeltavalla Jonskheere-Terpstran testillä, on suositeltavaa tarkastella tietojen muutosta tarvittaessa, jotta tietyn tilastollisen testin vaatimukset täytetään. Ei-parametrisena vaihtoehtona voidaan harkita Sunnin tai Mann-Whitneyn testejä. Yksittäisille käsittelyille lasketaan 95 prosentin luottamusväli.

([1]) Vahingossa tapahtuva kuolema: muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jonka on aiheuttanut vahinko (tunnettu syy).
([2]) Epähuomiossa tapahtunut kuolema: muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jolla ei ole tunnettua syytä.

Elossa olevien emojen määrä käsittelemättömissä kontrolleissa on hyväksyttävyysperuste, joten sitä on dokumentoitava ja se on ilmoitettava. Myös kaikki muut haitalliset vaikutukset, esim. epänormaali käytös ja toksikologisesti merkittävät havainnot olisi ilmoitettava loppuraportissa.

ECx

ECx-arvot, mukaan lukien niitä koskevat alhaisemmat ja ylimmät luottamusvälit, lasketaan sopivien tilastollisten menetelmien avulla (esimerkiksi logistinen funktio tai Weibullin funktio, viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai yksinkertainen interpolointi). Jos halutaan laskea EC10, EC_{50} tai jokin muu ECx-arvo, kaikista tiedoista on tehtävä regressioanalyysi.

NOEC/LOEC

Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC/LOEC-arvo, asianmukaisia tilastomenetelmiä tulee käyttää ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevan OECD:n asiakirjan nro 54 mukaan (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application) (4). Yleensä testikemikaalin haitallisia vaikutuksia verrattuna kontrolliin tutkitaan käyttämällä yksisuuntaista hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0{,}05$.

Normaalijakauman ja varianssin homogeenisuutta voidaan testata käyttämällä sopivaa tilastollista testiä, esim. Shapiron-Wilkin testiä ja Levenen testiä, vastaavasti ($p \leq 0{,}05$). Yksisuuntainen ANOVA sekä tämän jälkeisiä monivertailutestejä voidaan tehdä. Monivertailuja (esimerkiksi Dunnettin testiä) tai alaspäin askeltavia trenditestejä (esimerkiksi Williamsin testiä tai Jonckheere-Terpsrtan testiä) voidaan käyttää sen laskemiseen, onko kontrollien ja testikemikaalin eri pitoisuuksien välillä merkitseviä eroja ($p \leq 0{,}05$) (suositellun testin valinta OECD:n ohjeasiakirjan nro 54 mukaan (4)). Muutoin NOEC- ja LOEC-arvojen määrittämisessä voidaan käyttää parametrittomia menetelmiä (esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan tai Jonckheere-Terpstran trenditestiä).

Raja-annostesti

Jos raja-annostesti (kontrollin ja vain yhden käsittelyn vertailu) on tehty ja jos parametristen testimenetelmien vaatimukset (normaalius, homogeenisuus) täyttyvät, metrisiä vasteita voidaan arvioida Studentin testillä (t-testillä). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia (kuten Welchin testi) tai parametritonta testiä, kuten Mann-Whitney-U-testiä.

Kontrollien välisten (kontrolli ja liuotinkontrolli sekä dispergointiaineen kontrolli) merkitsevien erojen määrittämiseksi jokaisen kontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan testata raja-annoksen yhteydessä kuvatulla tavalla. Jos näissä testeissä ei havaita merkitseviä eroja, kaikki kontrollin ja liuotinkontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan yhdistää. Muussa tapauksessa kaikkia käsittelyjä tulee vertailla liuotinkontrolliin.

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus.

Testilajit:

— kyseessä oleva klooni (onko genotyyppi määritetty), hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet. Jos käytetään muuta lajia kuin *Daphnia magna*, tämä on perusteltava ja ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, vesikirppujen (*Daphnia magna*) lukumäärä litrassa kokeen alussa)

— valoisa aika ja valon intensiteetti

— testin suunnittelu (esim. rinnakkaisnäytteiden määrä, emojen määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

— käytetty viljelyneste yksityiskohtaisesti

— mahdollisesti käytetyn orgaanisen aineen koostumus, alkuperä, valmistusmenetelmä, varastovalmisteiden TOC/COD, testissä käytetyn viljelynesteen TOC/COD:n arviointi

— yksityiskohtaiset ruokintaa koskevat tiedot, mukaan lukien määrä (mg C/vesikirppu/vrk) ja esim. rehujen tyyppi, myös mahdollisten levien spesifiset nimet (lajit) ja kanta, jos ne tunnetaan, sekä viljelyolosuhteet

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja viljelynesteen vaihtotaajuus (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava).

Tulokset:

— mahdollisista alustavista kokeista saadut testikemikaalin stabiilisuutta koskevat tulokset

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testikemikaalin pitoisuus koeastioissa (ks. tuloslomakkeet, lisäys 5); lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä määritysraja

— testiastioissa käytetyn veden laatu (ts. pH, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus sekä tarvittaessa TOC ja/tai COD ja veden kovuus) (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 4)

— täydelliset rekisterit elävien jälkeläisten tuotannosta testin aikana kutakin emoa kohti (ks. esim. annettu tuloslomake, lisäys 4)

— emojen kuolemantapausten lukumäärä ja päivämäärät (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 4)

— lisääntymistuotoksen vaihtelukerroin (joka perustuu elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevaa emoa kohti)

— kuvaaja emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärästä kussakin rinnakkaistestissä lukuun ottamatta emoja, jotka ovat kuolleet vahingossa tai epähuomiossa testin aikana vs. testikemikaalin pitoisuus

— tarvittaessa kuvaaja elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärästä kussakin rinnakkaistestissä vs. testikemikaalin pitoisuus

— tarvittaessa pienin havaittavan vaikutuksen pitoisuus (LOEC) lisääntymiselle, mukaan lukien kuvaus käytetyistä tilastomenetelmistä ja ilmoitus havaitun vaikutuksen suuruudesta (tämän selvittämiseksi voidaan tehdä ennen kokeen alkua voima-analyysi) ja pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) lisääntymiselle; tiedot, siitä, mitä vastemuuttujaa on käytetty laskettaessa LOEC- ja NOEC-arvoa (joko elävien jälkeläisten kokonaismäärä emoa kohti, joka ei kuollut vahingossa tai epähuomiossa testin aikana tai elävien jälkeläisten kokonaismäärä elossa olevaa emoa kohti) ja tarvittaessa ilmoitetaan LOEC- tai NOEC-arvo emojen kuolleisuudesta

— tarvittaessa EC_x lisääntymiselle, luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia), sen laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafinen kuvaaja, pitoisuus-vastekäyrän kulmakerroin ja sen keskivirhe

— muut havaitut biologiset vaikutukset tai muut mittaukset: ilmoitetaan kaikki mahdolliset havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset (esim. emojen kasvu) sekä kaikki asianmukaiset perustelut

— selitykset testimenetelmästä poikkeamiseen.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20–21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257–265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775–782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Teoksessa: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Teoksessa: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) s. 144–148.

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1–8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053–2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459–466.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Ecx: Veteen liuotetun testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin laskun vesikirpun lisääntymisessä tietyllä altistusajanjaksolla.

Emoeläimet: Naarasvesikirput, jotka ovat mukana testin alussa ja joiden lisääntymistuotos määritetään.

Epähuomiossa tapahtunut kuolema: Muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jolla ei ole tunnettua syytä.

Havaitsemisraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan osoittaa, mutta ei mitata kvantitatiivisesti.

Jälkeläiset: Nuoret vesikirput, joita emoeläimet tuottavat testin aikana.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se ei liiku, ts. ei pysty uimaan tai sen raajoissa tai takaruumiissa ei havaita mitään liikettä sen jälkeen kun testiastiaa on ravisteltu varovasti 15 sekuntia. (Jos käytetään muuta määritelmää, se on ilmoitettava testiselosteessa ja sille on annettava lähdeviite.)

Lisääntymistuotos: Emoeläinten elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin ajankohdalla.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testipitoisuus, jolla kemikaalin havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkittävän vaikutuksen (todennäköisyystasolla $p < 0,05$) lisääntymiseen ja emokuolleisuuteen kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla. Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Määritysraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkittävää vaikutusta (todennäköisyystasolla $p < 0,05$).

Populaation ominaiskasvunopeus: Populaation kasvu, jossa yhdentyvät lisääntyminen ja ikäspesifinen kuolleisuus (1) (2) (3). Dynaamisessa tasapainossa olevassa populaatiossa ominaiskasvu on nolla. Suurenevissa populaatioissa se on positiivinen ja pienenevissä negatiivinen. Negatiivinen arvo johtaa luonnollisesti lopulta populaation häviämiseen.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Vahingossa tapahtuva kuolema: Muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jonka on aiheuttanut vahinko (tunnettu syy).

Lähdekirjallisuus

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, s. 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

Lisäys 2

KEMIALLISESTI MÄÄRITELTYJEN ELENDT M7- JA M4-VILJELYNESTEIDEN VALMISTUS

Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelynesteeseen

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- (1) tai M7-viljelynesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelynesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelynesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelynesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

Valmistaminen

Mineraalit

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (I) yksittäisistä mineraaleista sopivan puhtaaseen (esim. deionisoituun, tislattuun tai käänteisosmoosilla puhdistettuun) veteen. Näistä eri varastoliuoksista (I) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (II), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts.:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuoksia I	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-kertainen	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-kertainen	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kertainen	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kertainen	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-kertainen	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kertainen	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-kertainen	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-kertainen	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-kertainen	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-kertainen	1,0	1,0
KI	65	20 000-kertainen	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-kertainen	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-kertainen	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-kertainen	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-kertainen	—	—
Sekä Na_2EDTA- että $FeSO_4$-liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi. Tuloksena on:				
Fe-EDTA-liuos		1 000	20,0	5,0

M4- ja M7-viljelyneste

M4- ja M7-viljelynesteet valmistetaan käyttäen kantaliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Kantaliuos II (yhdistetyt hivenaineet)		20-kertainen	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-kertainen	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kertainen	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-kertainen	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-kertainen	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-kertainen	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-kertainen	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien kantaliuos	—	10 000-kertainen	0,1	0,1

Yhdistetty vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:

	mg/l			
Tiamiinihydrokloridi	750	10 000-kertainen		
Syaani-kobalamiini (B_{12})	10	10 000-kertainen		
Biotiini	7,5	10 000-kertainen		

Yhdistetty vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelynesteeseen vähän ennen käyttöä.

Huom. Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelynesteliuosta valmistettaessa, kantaliuokset lisätään 500–800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 1 litraksi.

Huom. M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

Lisäys 3

ORGAANISIIN YHDISTEISIIN SITOUTUNEEN HIILEN KOKONAISMÄÄRÄN (TOC) MÄÄRITYS JA NOMOGRAMMIN LAATIMINEN LEVÄREHUN TOC-PITOISUUDELLE

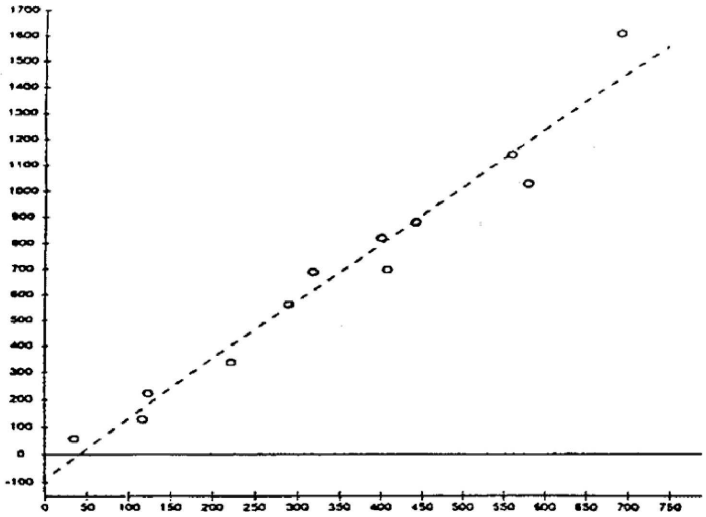
Levärehun hiilipitoisuutta ei tunnetusti mitata suoraan, vaan se määritetään korvaavilla menetelmillä kuten levysolujen määrän tai valon absorption perusteella laadittujen nomogrammien avulla.

TOC olisi mitattava mieluummin korkeassa lämpötilassa tapahtuvan oksidaation avulla kuin UV- tai persulfaattimenetelmällä. (Ks. ohjeeksi: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammin laatimista varten levät olisi erotettava viljelynesteestä sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen tislattuun veteen. Korvaava muuttuja ja TOC-pitoisuus määritetään kustakin näytteestä (kolme rinnakkaista). Tislattuun veteen perustuvat nollanäytteet määritetään ja niiden TOC-pitoisuus vähennetään levänäytteen TOC-pitoisuudesta.

Nomogrammien olisi oltava lineaarisia tarvittavalla hiilipitoisuusalueella. Jäljempänä annetaan esimerkkejä:

Huom. Näitä nomogrammeja ei saisi käyttää muuntamiseen. Jokaisen laboratorion on laadittava omat nomogrammit.



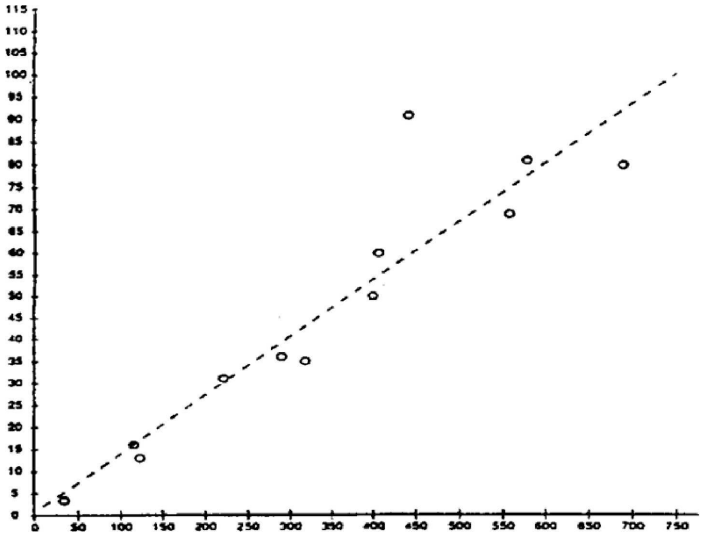
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regressiokuvaaja, mg/l kuivapaino vs. mg C/l. Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: mg/l konsentroidun levärehun kuivapainoa

Korjauskerroin -0,980



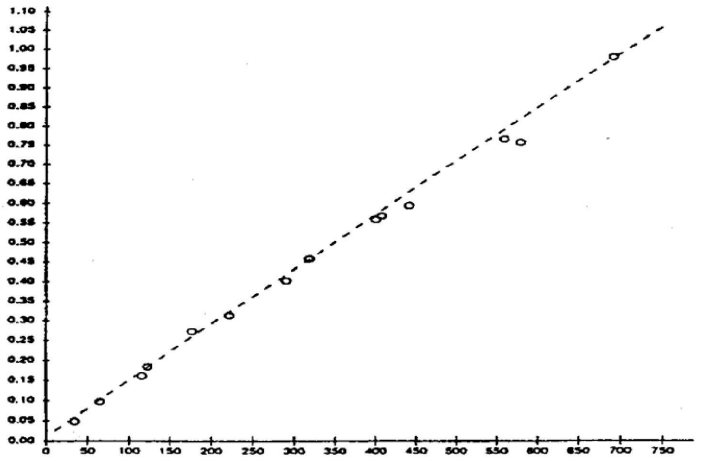
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regressiokuvaaja, solumäärä vs. mg C/l. Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: solujen lukumäärä/1 konsentroitua levärehua

Korjauskerroin -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Valon absorption regressio mg C/1 (1 senttimetrin valotiellä). Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: konsentroidun levärehun 1/10-laimennoksen absorbanssi aallonpituudella 440 nm

Korjauskerroin – 0,998

Lisäys 4

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN VILJELYNESTEEN VAIHDOT, FYSIKAALISET JA/TAI KEMIALLISET SEURANTATIEDOT, RUOKKIMINEN, VESIKIRPUN LISÄÄNTYMINEN JA EMOKUOLLEISUUS

Koe nro:	Aloituspvm:						Klooni:			Aine:				Ravintotyyppi:				Testikemikaali:					Nimellispitoisuus:	
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Viljelynesteen vaihto (rasti)																								
pH (*)																							uusi	
																							vanha	
O_2 (mg/l) (*)																							uusi	
																							vanha	
Lämpötila (°C) (*)																							uusi	
																							vanha	
Ruokkiminen (rasti)																								
Elävien jälkeläisten määrä (**)																								Yhteensä
Astia 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Yhteensä	
Kumulatiivinen emokuolleisuus (***)																								

(*) Ilmoitettava, mitä astiaa käytettiin kokeeseen
(**) Abortoidut sikiöt kirjataan merkinnällä 'AB' asianomaiseen ruutuun
(***) Kuolleet aikuiset kirjataan merkinnällä 'M' asianomaiseen ruutuun

Lisäys 5

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN KEMIALLISTEN MÄÄRITYSTEN TULOKSET

(a) **Mitatut pitoisuudet**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

(b) **Mitatut pitoisuudet prosentteina nimellisarvoista**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

Lisäys 6

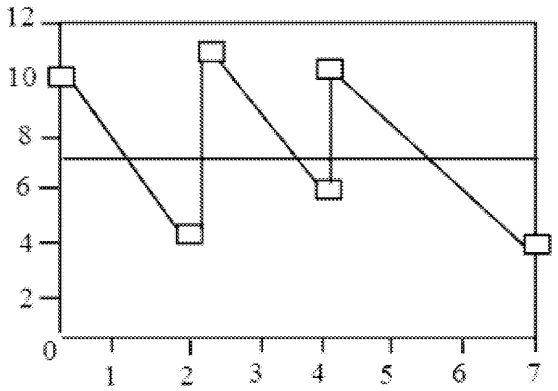
AIKAPAINOTETUN KESKIARVON LASKEMINEN

Aikapainotettu keskiarvo

Koska testikemikaalin pitoisuus voi laskea viljelynesteen vaihtojen välillä, on harkittava, mikä pitoisuus olisi valittava edustamaan sitä pitoisuusaluetta, jossa emovesikirppu on elänyt. Valinnan pitäisi perustua sekä biologisiin että tilastollisiin näkökohtiin. Jos esimerkiksi oletetaan, että lisääntymiseen vaikuttaa lähinnä huippupitoisuus, olisi käytettävä suurinta pitoisuutta. Jos taas oletetaan, että myrkyllisen kemikaalin kerääntynyt tai pitkän aikavälin vaikutus on tärkeämpi, keskipitoisuus sopii paremmin. Silloin käytettäväksi sopiva asianmukainen keskiarvo on aikapainotettu keskipitoisuus, koska siinä otetaan huomioon hetkellisten pitoisuuksien vaihtelu ajan funktiona.

Kuva 1

Esimerkki aikapainotetusta keskiarvosta



Päivää

Kuvassa 1 on (yksinkertaistettu) esimerkki testistä, joka kestää seitsemän päivää ja jossa viljelyneste vaihdetaan päivinä 0, 2 ja 4.

— Ohut sahaviiva kuvaa pitoisuutta eri ajankohtina. Pitoisuuden laskun oletetaan noudattavan eksponentiaalista hajoamisprosessia.

— Kuusi kuvaajaan merkittyä pistettä edustavat havaittuja pitoisuuksia, jotka on mitattu kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa.

— Paksu yhtenäinen viiva esittää aikapainotetun keskiarvon sijaintia.

Aikapainotettu keskiarvo lasketaan siten, että aikapainotetun keskiarvon kuvaajan alle jäävä pinta-ala on yhtä suuri kuin pitoisuuskäyrän alle jäävä pinta-ala. Edellä olevaa esimerkkiä varten tehty laskutoimitus kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1

Aikapainotetun keskiarvon laskeminen

Uudista-minen Nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Uudista-minen Nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Päivien koko-nais-määrä:	7				Kokonais-pinta-ala:	50,092
					Aikapaino-tettu keski-arvo:	7,156

”Päiviä” on vaihtojen välissä olevien päivien määrä

”Conc 0” on kunkin vaihtoperiodin alussa mitattu pitoisuus

”Conc 1” on kunkin vaihtoperiodin lopussa mitattu pitoisuus

”Ln(Concs 0)” on Conc 0:n luonnonlogaritmi

”Ln(Concs 1)” on Conc 1:n luonnonlogaritmi

”Pinta-ala” on kutakin vaihtoperiodia vastaavan eksponentiaalisen käyrän alle jäävä pinta-ala Se lasketaan seuraavasti:

$$Pinta\text{-}ala = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Aikapainotettu keskiarvo (*TW Mean*) on kokonaispinta-ala (*Total Area*) jaettuna päivien kokonaismäärällä (*Total Days*).

Vesikirpun lisääntymistestiä varten taulukon on tietysti katettava 21 päivää.

On selvää, että kun havaintoja tehdään vain kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa, ei voida olla varmoja siitä, että hajoaminen on todella eksponentiaalista. Erilaisesta käyrästä olisi seurauksena erilainen pinta-ala. Eksponentiaalinen hajoamisprosessi ei kuitenkaan ole epätodennäköinen, ja sitä kuvaava käyrä on todennäköisesti paras, jota voidaan käyttää, kun muuta tietoa ei ole.

On kuitenkin esitettävä varoitus siltä varalta, että kemiallisessa määrityksessä ei havaita kyseistä kemikaalia lainkaan vaihtoperiodin lopussa. Ellei voida arvioida, kuinka nopeasti kemikaali on hävinnyt liuoksesta, on mahdotonta saada todenmukaista pinta-alaa käyrän alle ja myös mahdotonta määrittää järkevää aikapainotettua keskiarvoa.

Lisäys 7

OHJEET VASTASYNTYNEEN SUKUPUOLEN TUNNISTAMISEKSI

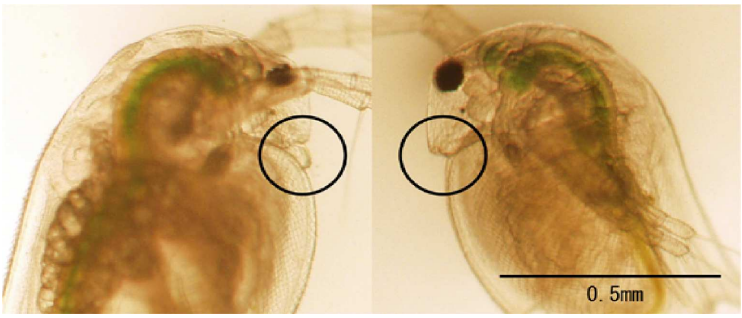
Vastasyntyneiden koiraiden tuotantoa voi esiintyä muuttuvissa ympäristöolosuhteissa, kuten lyhennetty valoisa aika, lämpötila, ravinnon pitoisuuden vähentäminen ja populaatiotiheyden lisääminen (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992) Koiraiden tuotanto on myös tunnettu vaste tietyille hyönteisten kasvunsääteille (Oda *et al.*, 2005). Olosuhteissa, joissa kemialliset stressitekijät aiheuttavat partenogeeneettisten naaraiden lisääntymiskykyisten jälkeläisten vähentymistä, koiraiden määrän odotetaan lisääntyvän (OECD, 2008). Käytettävissä olevien tietojen perusteella ei ole mahdollista ennustaa, mikä sukupuolten suhde tai lisääntymisen päätepiste on herkempi; on kuitenkin viitteitä siitä (viite "validaatioraportti", osa 1), että tämä koirasten määrän kasvu voi olla vähemmän herkkä kuin jälkeläisten vähentyminen. Koska tämän testimenetelmän pääasiallinen tarkoitus on arvioida tuotettujen jälkeläisten määrä, koirasten ilmaantuminen on valinnainen havainto. Jos tätä valinnaista päätepistettä arvioidaan tutkimuksessa, olisi sovellettavaa täydentävää testin validiteettiperustetta, jonka mukaan kontrollissa olisi käytettävä enintään 5 prosenttia koiraita.

Käytännöllisin ja helpoin tapa erottaa vesikirpun sukupuoli on käyttää fenotyyppisiä ominaisuuksia, koska koiraat ja naaraat ovat geneettisesti identtisiä ja niiden sukupuolen määrää ympäristö. Koiraat ja naaraat ovat eri pituisia ja niiden ensimmäisillä tuntosarvilla on eri morfologia, koiraiden ovat pidemmät kuin naaraiden (kuva 1). Tämä ero on tunnistettavissa heti syntymän jälkeen, vaikka muut toissijaiset sukupuoliominaisuudet kehittyvät iän myötä (ks. esim. kuva 2, Olmstead and LeBlanc, 2000).

Morfologisen sukupuolen havainnointia varten kunkin koe-eläimen tuottamat vastasyntyneet olisi siirrettävä pipetillä ja asetettava petrimaljaan viljelynesteen kanssa. Viljelyneste pidetään minimissä eläinten liikkumisen hillitsemiseksi. Ensimmäisiä tuntosarvia koskevat havainnoinnit voidaan tehdä stereomikroskoopilla (× 10–60).

Kuva 1

24 tuntia vanha vesikirppukoiras (vasemmalla) ja vesikirppunaaras (oikealla). Koiraat voidaan erottaa naaraista pituuden ja niiden ensimmäisten tuntosarvien morfologian perusteella, kuten esitetään ympyröissä (Tatarazako *et al.*, 2004).



VIITTEET

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255–2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168–1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19: 2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439–449."

18) Korvataan C osassa olevan C.29 luvun 66 kohta seuraavasti:

"66. Testi on luotettava, jos

a) keskimääräinen hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailukemikaalia, on > 60 prosenttia 14. inkubaatiopäivään mennessä ja

b) TIC:n keskimääräinen määrä kontrollipulloissa F_B testin lopussa on > 3mg C/l.

Jos nämä ehdot eivät täyty, testi on toistettava käyttämällä toisesta lähteestä saatua siirrosainetta ja/tai testivaiheet on käytävä läpi. Jos esimerkiksi ongelmana on suuri IC-tuotanto kontrollipulloissa, on noudatettava kohdissa 27–32 annettuja ohjeita."

19) Lisätään C osaan luvut seuraavasti:

"C.47 **Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheissa**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 210 (2013). Kalojen varhaiskehitysvaiheissa tehtävien testien avulla on tarkoitus määrittää kemikaalien letaalit ja subletaalit vaikutukset tietyn lajin tietyissä kehitysvaiheissa. Niistä saadaan arvokasta tietoa kemikaalista muille kalalajeille aiheutuvien kroonisten letaalien ja subletaalien vaikutusten estimointia varten.

2. Testiohje nro 210 perustuu Yhdistyneen kuningaskunnan ehdotukseen, josta keskusteltiin Medmenhamissa (Yhdistyneessä kuningaskunnassa) marraskuussa 1988 kokoontuneessa OECD:n asiantuntijakokouksessa. Testiohje on saatettu ajan tasalle vuonna 2013 testin käytöstä saadun kokemuksen ja syyskuussa 2010 järjestetyssä toksisuustestausta kaloilla käsittelevässä OECD:n seminaarissa annettujen suositusten (1) perusteella.

TESTIN PERIAATE

3. Varhaiskehitysvaiheissa olevia kaloja altistetaan veteen liuotetun testikemikaalin eri pitoisuuksille. Läpivirtausolosuhteita pidetään parhaimpina, mutta jos niiden järjestäminen ei ole mahdollista, semistaattiset olosuhteet voidaan hyväksyä. Tarkat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta ohjeasiakirjasta (2). Testi aloitetaan asettamalla hedelmöityneet mätimunat testiastioihin, ja sitä jatketaan lajikohtaisesti tarvittavan ajan, kunnes kontrollikalat saavuttavat nuoren kalan eli juveniilin elinvaiheen. Letaalit ja subletaalit vaikutukset arvioidaan ja niitä verrataan kontrolliarvioihin, jotta voidaan määrittää pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) ja sen avulla edelleen i) pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) ja/tai ii) EC_x (esimerkiksi EC_{10} ja EC_{20}) käyttämällä regressiomallia, jonka avulla estimoidaan x prosentin muutoksen mitattavassa vaikutuksessa aiheuttava pitoisuus. Vaikuttavien pitoisuuksien ja parametrien ilmoittaminen saattaa vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta EC_x saadaan interpoloimalla eikä ekstrapoloimalla (määritelmistä ks. lisäys 1).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

4. Testikemikaalilla tarkoitetaan testattavaa ainetta tai seosta. Testikemikaalin vesiliukoisuus (ks. tämän liitteen A.6 luku) ja höyrynpaine (ks. tämän liitteen A.4 luku) on oltava tiedossa, ja kemikaalin kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka oikeellisuus on tiedossa ja raportoitu, ja määritysrajan oltava saatavissa. Vaikka akuuttia toksisuutta koskevan testin (ks. tämän liitteen C.1 tai C.49 luku) tekeminen ei ole välttämätöntä, testin tekeminen mieluiten tähän testiin valitulla lajilla saattaa antaa hyödyllistä tietoa.

5. Jos testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen, seoksen koostumus on luonnehdittava mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja (muun muassa edellä mainittujen) ainekohtaisten erityisominaisuuksien avulla. Ennen kuin testimenetelmää käytetään lainsäädännössä edellytettyyn seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset lainsäädännön tavoitteen kannalta.

6. Hyödyllisiä tietoja ovat muun muassa rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a, P_{OW} ja nopean biohajoavuuden testin tulokset (ks. tämän liitteen C.4 tai C.29 luku).

TESTIN VALIDITEETTI

7. Testi on luotettava (validi), jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

— Liuenneen hapen pitoisuus on > 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan.

— Veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,5 °C testiastioiden välillä tai peräkkäisinä päivinä milloin tahansa testin aikana ja on niissä rajoissa, jotka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2).

— Testattavien pitoisuuksien mittaaminen on pakollista.

— Hedelmöityneiden mätimunien ja kuoriutuneiden poikasten eloonjäämisaste kontrolleissa ja tapauksen mukaan liuotinkontrolleissa on vähintään yhtä suuri kuin lisäyksessä 2 on määritelty.

8. Jos validiteettikriteereistä havaitaan vähäinen poikkeama, sen vaikutuksia testitietojen luotettavuuteen on harkittava ja harkinnan tulokset sisällytettävä raporttiin. Vaikutukset eloonjäämiseen, kuoriutumiseen tai kasvuun liuotinkontrollissa verrattuna negatiiviseen kontrolliin on ilmoitettava ja niistä on keskusteltava testitietojen luotettavuuden kannalta.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

9. Mitä tahansa lasista, ruostumattomasta teräksestä tai muusta kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettua astiaa voi käyttää. Koska silikonin tiedetään pystyvän voimakkaasti absorboimaan lipofiilisiä aineita, silikoniputkia on käytettävä läpivirtaustutkimuksissa mahdollisimman vähän, samoin kuin silikonitiivisteitä kosketuksissa veden kanssa, käyttämällä esimerkiksi yhtenäisrakenteista lasiakvaariota. Astioiden on oltava riittävän suuria, jotta kunnon kasvu kontrollissa on mahdollinen, liuenneen hapen riittävä pitoisuus voidaan pitää yllä (esim. pienillä kalalajeilla tämä saavutetaan käyttämällä 7 litran tankkia) ja 19 kohdassa annettuja mätimäärää koskevia kriteerejä voidaan noudattaa. Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan testialueelle satunnaistetusti. Satunnaistettu lohkoasetelma siten, että kussakin käsittelyssä olevia testiastioita on kussakin lohkossa, on parempi kuin täysin satunnaistettu järjestely. Testiastiat on suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä. Testijärjestelmää on suotavaa sopeuttaa testikemikaalin pitoisuuksilla riittävän kauan, jotta voidaan osoittaa vakaat altistuspitoisuudet ennen testieliöiden lisäämistä.

Lajin valinta

10. Suositeltavat kalalajit luetellaan taulukossa 1. Muitakin lajeja saa käyttää, mutta testimenetelmää on mahdollisesti mukautettava, jotta testiolosuhteet ovat sopivat. Tällaisessa tapauksessa on selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

Siitoskalojen kasvatus

11. Siitoskannan kasvatuksesta tyydyttävissä oloissa annetaan yksityiskohtaiset ohjeet lisäyksessä 3 ja mainituissa viitteissä (3) (4) ja (5).

Hedelmöityneiden mätimunien, alkioiden ja toukkien käsittely

12. Aluksi hedelmöityneiden mätimunien, alkioiden ja toukkien altistus voidaan tehdä ison astian sisällä olevissa pienemmissä lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistetuissa astioissa, joiden laidoissa tai päädyissä on verkot, jolloin testiliuos pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi voidaan johtaa pyörteetön virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että eliöt ovat nestepinnan alla koko ajan. Hedelmöityneitä lohensukuisten kalojen mätimunia voidaan pitää telineissä tai verkoissa, joiden reiät ovat niin suuret, että toukat putoavat niistä läpi kuoriuduttuaan.

13. Jos mätimunien pitämiseksi isossa testiastiassa käytetään telineitä, ritilöitä tai verkkoja, ne on poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen lisäyksessä 3 annettujen ohjeiden mukaisesti. Verkot pitää kuitenkin säilyttää toukkien karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia on siirrettävä, niitä ei saa ottaa vedestä ilmaan eikä verkkoja saa käyttää toukkien irrottamiseksi mätimunatelineistä. Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, ja se on kirjattava raporttiin. Siirto ei kuitenkaan ehkä ole aina tarpeen.

Vesi

14. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji selviytyy ja kasvaa riittävän pitkän ajan (ks. lisäys 4). Veden laadun on oltava vakio koko testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa kemikaalia) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), ammoniakki, jäännösklooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi puolivuosittain, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun tiedetään vaihtelevan, mittaukset on tehtävä useammin; mittaustiheys riippuu vaihtelun määrästä. Lisäyksessä 4 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden ominaisuuksia.

Testiliuokset

15. Läpivirtaustesteissä on käytettävä testikemikaalin varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (3). Jos 19 kohdassa määritettyä mätimäärää noudatetaan, on mahdollista käyttää alhaisempaa virtausnopeutta, esim. kaksi tai kolme kertaa testiastian tilavuus, jotta ravinnon nopea poistuminen voidaan estää.

16. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista ja/tai ultraääntä). Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) tai passiivisia annostelumenetelmiä (6) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimen käyttöä kantoaineena ei suositella. Jos liuotin on kuitenkin tarpeen, rinnalla on käytettävä liuotinkontrollia, ja liuotinpitoisuuden on oltava sama kuin kemikaalilla käsittelyissä. Toisin sanoen liuotintason on mielellään oltava sama kaikilla pitoisuuksilla ja liuotinkontrollissa. Joissakin laimenninjärjestelmissä tämä saattaa olla teknisesti vaikeaa; tällöin liuotinkontrollin liuotinpitoisuuden on vastattava käsittelyryhmän korkeinta liuotinpitoisuutta. Vaikeasti testattavia aineita koskevat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta OECD:n ohjeasiakirjasta nro 23 (2). Jos liuotinta käytetään, liuotin valitaan aineen kemiallisten ominaisuuksien perusteella. OECD:n ohjeasiakirjassa nro 23 enimmäispitoisuudeksi suositellaan 100 µl/l. Liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman alhaisena, jotta vältetään liuottimen mahdollinen vaikutus mitattuihin ominaisuuksiin (7).

17. Semistaattisessa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: joko uudet testiliuokset valmistellaan puhtaisiin astioihin ja eloonjääneet mätimunat ja toukat siirretään varovasti uusiin astioihin tai testieliöt pidetään testiastioissa samalla, kun osa (vähintään kaksi kolmasosaa) testiliuoksesta/kontrollimäärästä vaihdetaan.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Kesto

18. Testi on aloitettava mahdollisimman pian sen jälkeen, kun mätimunat ovat hedelmöityneet, ja ne on mielellään upotettava testiliuokseen, ennen kuin sukusolujen jakautuminen alkaa, tai mahdollisimman lähellä tätä vaihetta. Testin kesto riippuu käytettävästä lajista. Lisäyksessä 2 annetaan joitakin suosituksia testin kestosta.

Täyttö

19. Testin alussa hedelmöityneiden mätimunien määrän on oltava riittävä tilastollista käsittelyä varten. Ne on jaettava satunnaisesti käsittelyryhmiin, ja kutakin pitoisuutta kohden on käytettävä vähintään 80 mätimunaa, jotka on jaettava tasan vähintään neljään rinnakkaiseen testiastiaan. Mätimäärän (biomassa testiliuoksen tilavuusyksikköä kohti) on oltava niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan muna- ja toukkavaiheen ajan pitää vähintään 60 prosentissa ilman kyllästysarvosta ilman ilmastusta. Suositusten mukaan mätimäärän tuorepaino saa läpivirtaustesteissä olla enintään 0,5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana (3).

Valo ja lämpötila

20. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan on oltava sopivia käytetylle testilajille (ks. lisäys 2).

Ruokinta

21. Ravinto ja ruokinta ovat kriittisiä, ja on olennaisen tärkeää, että kussakin elinvaiheessa annetaan oikeaa ravintoa oikeaan aikaan ja riittävästi normaalin kasvun turvaamiseen. Ruokinnan on oltava suunnilleen sama rinnakkaisissa astioissa, ellei sitä mukauteta kuolleisuuden huomioon ottamiseksi. Jätteen kertymisen välttämiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on tarvittaessa poistettava. Yksityiskohtaiset ruokintajärjestelmät on esitetty lisäyksessä 3, mutta ravinto- ja ruokintajärjestelmiä kehitetään jatkuvasti kokemuksen karttuessa, jotta eloonjääminen ja kasvu voidaan optimoida. Elävä ravinto lisää ympäristön virikkeellisyyttä, joten sitä on käytettävä kuiva- tai pakasteravinnon sijasta tai lisäksi aina, kun se on lajin ja elinvaiheen kannalta asianmukaista.

Testipitoisuudet

22. Tavallisesti tarvitaan viisi testikemikaalin pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 3,2-kertainen, ja vähintään neljä rinnakkaisastiaa pitoisuutta kohden. Kun valitaan testipitoisuuksien vaihteluvälit, on otettava huomioon akuuteista testeistä mielellään samoilla lajeilla ja/tai pitoisuusalueen määritystestistä mahdollisesti saadut tiedot (1). Testipitoisuuksien vaihteluvälin valinnassa on kuitenkin otettava huomioon kaikki mahdolliset tietolähteet, kuten päättelyarviot kalojen alkioilla tehdyistä akuuttia toksisuutta koskevista testeistä. Raja-annostesti tai jatkettu raja-annostesti, jossa on lopullisessa testissä alle viisi pitoisuutta, voidaan hyväksyä, jos on vahvistettava vain empiirinen NOEC-arvo. Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Testikemikaalin pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 96 tunnin LC_{50}, tai 10 mg/l (näistä alhaisempi arvo), ei tarvitse testata.

Kontrollit

23. Testikemikaalin pitoisuussarjan lisäksi on määritettävä laimennusvesikontrolli ja tarvittaessa pelkkää kantoaineena käytettävää liuotinta sisältävä liuotinkontrolli (ks. 16 kohta).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

24. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti kaikissa rinnakkaisastioissa (esimerkiksi mittaamalla testipitoisuudet). Tarvittavat analyysimenetelmät on määritettävä, myös asianmukainen kvantifiointiraja (LOQ), ja aineen stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin altistumisen luonnehtimiseksi. Vähintään viisi määritystä tarvitaan. Läpivirtausjärjestelmissä testikemikaali on vähintään kerran viikossa mitattava yhdessä rinnakkaisnäytteessä pitoisuutta kohti, siten että mitattavaa rinnakkaisnäytettä vaihdetaan järjestelmällisesti. Analyyttiset lisämääritykset parantavat usein testituloksen laatua. Näytteet on ehkä suodatettava hiukkasten poistamiseksi (käyttämällä esim. 0,45 µm:n huokoskokoa) tai sentrifugoitava sen varmistamiseksi, että kemikaalin määritys tehdään aidosta liuoksesta. Suodattimet on kyllästettävä ennen käyttöä testikemikaalin adsorption vähentämiseksi. Jos mitatut pitoisuudet eivät pysy 80–120 prosentissa nimellispitoisuudesta, vaikuttavat pitoisuudet on määritettävä ja ilmaistava suhteessa läpivirtaustestien aritmeettiseen keskipitoisuuteen (ks. aritmeettisen keskiarvon laskenta, testimenetelmän C.20 lisäyksessä 6 (8)) ja suhteessa semistaattisten testien mitattujen pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon (ks. vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan luku 5 (2)).

25. Testin aikana liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava kaikissa testiasioissa vähintään viikoittain ja suolapitoisuus ja kovuus tarvittaessa testin alussa ja lopussa. Lämpötilaa on mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

Havainnot

26. **Alkiokehitysvaihe**: Testikemikaalille altistuksen alussa alkiokehitysvaihe on varmistettava mahdollisimman tarkasti. Siinä voidaan käyttää sopivasti säilytettyä ja puhdistettua edustavaa näytettä mätimunista.

27. **Kuoriutuminen ja eloonjääminen**: Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä on tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Jos mätimunissa havaitaan sieniä alkiokehityksen varhaisvaiheessa (eli testin ensimmäisenä tai toisena päivänä), sellaiset mätimunat on laskettava ja poistettava. Kuolleet alkiot, toukat ja juveniilit on poistettava heti, kun ne havaitaan, koska ne voivat hajota nopeasti ja muut kalat saattavat rikkoa ne. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia mätimunia tai toukkia vahingoiteta fyysisesti. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheissa ja eri lajeilla eri tavoin. Esimerkiksi

— hedelmöityneet mätimunat: erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys

— alkiot, toukat ja juveniilit: koe-eläimet eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai ne eivät reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

28. **Epänormaali ulkonäkö**: Sellaisten toukkien tai juveniilien lukumäärä, joiden ruumiinmuodossa havaitaan epänormaaliutta, on kirjattava määräajoin testin kestosta ja kuvatun epänormaaliuden laadun mukaan. On huomattava, että epänormaaleja toukkia ja juveniileja esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi joillakin lajeilla olla useita prosentteja kontroll(e)issa. Jos epämuodostumia ja niihin liittyvää epänormaalia käytöstä pidetään niin vakavana, että eliö kärsii huomattavasti ja se on saavuttanut pisteen, jossa toipuminen ei ole mahdollista, eliö voidaan poistaa testistä. Tällaiset eläimet on lopetettava ja lisättävä kuolleisuuslukuihin myöhemmin tehtävässä analyysissa. Useimmilla lajeilla, joita on suositeltu käytettäväksi tässä testimenetelmässä, on rekisteröity normaalia alkiokehitystä (9) (10) (11) (12).

29. **Epänormaali käyttäytyminen**: Epänormaali käyttäytyminen, esimerkiksi hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, epätyypillinen liikkumattomuus ja epätyypillinen syömiskäyttäytyminen, on kirjattava sopivin väliajoin testin aikana (esim. kerran päivässä lämpimän veden lajeilla). Vaikka tällaisia vaikutuksia on vaikea kvantifioida, niiden havainnoiminen voi auttaa kuolleisuusdatan tulkinnassa.

30. **Paino**: Kaikki eloonjääneet kalat punnitaan testin lopuksi vähintään rinnakkaisastiakohtaisesti (ilmoitetaan astiassa olevien eläinten lukumäärä ja keskipaino eläintä kohden). Tuorepainoa (eläimet kuivataan pinnalta) pidetään parempana, mutta myös kuivapainotiedot saa ilmoittaa (13).

31. **Pituus**: Testin lopussa mitataan yksilöiden pituus. Kokonaispituus on suositeltava, mutta jos pyrstöevä tai muut evät ovat syöpyneet, voidaan käyttää vakiopituutta. Kussakin testissä on käytettävä samaa menetelmää kaikkiin kaloihin. Yksilön pituus voidaan mitata käyttämällä esimerkiksi työntömittaa, digitaalista kameraa tai kalibroitua okulaarimikrometriä. Tyypilliset vähimmäispituudet on määritelty lisäyksessä 2.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

32. On suositeltavaa, että kokeen suunnittelu ja tilastollisen testin valinta mahdollistavat riittävän voiman (vähintään 80 prosenttia) havaita biologisesti merkittävät muutokset tutkittavissa ominaisuuksissa, jos on ilmoitettava NOEC. Vaikuttavien pitoisuuksien ja parametrien ilmoittaminen saattaa vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Jos on ilmoitettava EC_x, koe on suunniteltava ja regressiomenetelmä valittava siten, että EC_x:n estimoinnissa i) EC_x:lle ilmoitettu 95 prosentin luottamusväli ei sisällä nollaa eikä ole liian suuri, ii) ennakoidulle keski-EC_x:lle ilmoitettu 95 prosentin luottamusväli ei sisällä kontrollikeskiarvoa ja iii) regresssiomalli ei ole merkitsevästi yhteensopimaton tietojen kanssa. Kumpikin menetelmä edellyttää, että jokaisessa tutkittavassa ominaisuudessa, joka on tärkeä havaita tai estimoida, todetaan prosentuaalinen muutos. Koesuunnitelma on mukautettava siten, että se on mahdollista. Jos edellä mainitut EC_x:n määrittämistä koskevat edellytykset eivät täyty, on käytettävä NOEC-menetelmää. Ei ole todennäköistä, että sama prosentuaalinen muutos koskisi kaikkia tutkittavia ominaisuuksia. Ei ole myöskään todennäköistä, että voitaisiin suunnitella toteutuskelpoinen testi, joka täyttäisi nämä kriteerit kaikkien tutkittavien ominaisuuksien osalta, joten on tärkeää keskittyä niihin ominaisuuksiin, jotka ovat kussakin testissä tärkeitä, jotta se voidaan suunnitella asianmukaisesti. Lisäyksissä 5 ja 6 on annettu tilastollisia vuokaavioita ja ohjeita kutakin menetelmää varten. Niissä annetaan ohjeita tietojen käsittelyyn ja asianmukaisimman tilastollisen testin tai mallin käytön valintaan. Muitakin tilastomenetelmiä saa käyttää, jos ne ovat tieteellisesti perusteltavissa.

33. Variaatiot on analysoitava kussakin rinnakkaisnäytesarjassa varianssianalyysillä tai kontingenssitaulukkomenetelmillä, ja analyysiin perustuvia asianmukaisia tilastollisia analyysimenetelmiä on käytettävä. Jos halutaan tehdä yhteisvertailu yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien välillä, jatkuvaa vastetta varten suositellaan Jonckheere-Terpstran tai Williamsin vertailutestiä ja sellaisia dikotomisia vasteita varten Cochran-Armitagen vertailutestiä, jotka ovat yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vastesuhteen kanssa eikä ole näyttöä ylihajonnasta (14). Jos ylihajonnasta on näyttöä, suositellaan käytettäväksi Cochran-Armitagen testin Rao-Scott-muunnosta (15) (16) tai Williamsin tai Dunnettin testiä (arcussinimuunnoksen jälkeen) tai Jonckheere-Terpstran testiä rinnakkaisosuuksiin. Jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vastesuhteen kanssa, Dunnettin tai Dunnin tai Mann-Whitneyn menetelmät saattavat olla hyödyllisiä jatkuvissa vasteissa ja Fisherin tarkka testi dikotomisissa vasteissa (14) (17) (18). Kaikkien tilastomenetelmien tai -mallien käytössä on huolellisesti varmistettava, että kyseisen menetelmän tai mallin edellytykset täyttyvät (esim. astiakohtainen vaihtelu estimoidaan ja otetaan huomioon kokeen suunnittelussa ja testin tai mallin käytössä). Tietojen normaalius on arvioitava, ja lisäyksessä 5 ilmoitetaan, mitä ANOVAn jäännöksille on tehtävä. Lisäyksessä 6 käsitellään tarkemmin regressiomenetelmään liittyviä näkökohtia. Tilastollisen testin edellytysten täyttämiseksi on harkittava muunnoksia. Regressiomallin sovittamisen edellyttämät muunnokset vaativat kuitenkin suurta huolellisuutta, sillä esimerkiksi 25 prosentin muutos muuntelemattomassa vasteessa ei vastaa 25 prosentin muutosta muunnetussa vasteessa. Kaikissa analyyseissa analysoitava yksikkö ja koeyksikkö on testiastia, ei yksittäinen kala, joten sekä hypoteesitestien että regression on vastattava sitä (3) (14) (19) (20).

Testiraportti

34. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

Yhdestä ainesosasta koostuvat aineet:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS nimi, CAS numero, SMILES tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot siltä osin, kuin se on tarpeen ja käytännössä mahdollista, jne. (tarvittaessa myös orgaanisen hiilen pitoisuus)

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esim. kemialliset tunnistetiedot (kuten edellä), määrällinen esiintyminen ja ainesosien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta, lähde ja hedelmöityneiden mätimunien keruumenetelmä ja jatkokäsittely

Testiolosuhteet:

— testauksessa käytetty menetelmä (esim. semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, täyttötapa)

— valoisa aika (valoisat aikajaksot)

— testisuunnitelman kuvaus (esim. testiastioiden määrä, rinnakkaisnäytteiden määrä, mätimunien määrä rinnakkaisnäytettä kohden, testiastioiden materiaali ja koko (korkeus, leveys, tilavuus), vesimäärä testiastiaa kohden)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuutta aidossa liuoksessa

— laimennusveden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspensiossa olevat kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehu(je)n tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotaajuus)

Yksittäin (tai rinnakkaisnäyteperusteella) ja tarvittaessa keskiarvoina ja variaatiokertoimina ilmoitetut seuraavia tutkittavia ominaisuuksia koskevat tulokset:

— näyttö siitä, että kontrollit täyttävät yleiset testilajin elinkyvyn hyväksyttävyyttä koskevat vaatimukset (lisäys 2)

— kuolleisuustiedot kussakin vaiheessa (alkio, toukka ja juveniili) ja kertyvä kuolleisuus

— päivää kuoriutumiseen, kuoriutuneiden toukkien lukumäärä kunakin päivänä ja kuoriutumisen päättyminen

— terveiden kalojen lukumäärä testin lopussa

— eloonjääneiden eläinten pituus (on ilmoitettava, onko kyseessä vakio- vai kokonaispituus) ja paino

— mahdollisten epämuodostumien ilmaantuvuus, kuvaus ja lukumäärä

— mahdollisten käyttäytymismuutosten ilmaantuvuus, kuvaus ja lukumäärä

— tilastollinen analyysimenetelmä (regressio- tai varianssianalyysi) ja tietojenkäsittelymenetelmä (käytetty tilastollinen testi tai malli)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia kullekin arvioidulle vasteelle (NOEC)

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (p = 0,05) kullekin arvioidulle vasteelle (LOEC)

— tarvittaessa EC_x kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut mallimuuttujat ja niiden vakiovirheet.

Kaikki poikkeamat testimenetelmästä

Tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin

Taulukko 1

Kalalajit, joita suositellaan käytettäväksi testissä

MAKEAN VEDEN KALAT	SUISTO- JA MERIKALAT
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	*Cyprinodon variegatus* Loistohammaskarppi
Pimephales promelas Rasvapäämutu	*Menidia* sp. Hopeakylki
Danio rerio Seeprakala	
Oryzias latipes Medaka	

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Pariisi.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD, Pariisi.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 s.

(4) Brauhn, J. L. ja Schoettger, R. A. (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W. A. ja Jones, B. R. (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici ja muut (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593–599.

(7) Hutchinson, T. H. ja muut (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69–92.

(8) Tässä liitteessä oleva C.20 luku. Lisääntymistesti vesikirpulla (*Daphnia magna*).

(9) Hansen, D. J. ja Parrish, P. R. (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (toim. Mayer, F. L. ja Hamelink, J. L.), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B. ja muut (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

(11) Gonzalez-Doncel, M. ja muut (2005), A quick reference guide to the normal development of Oryzias latipes (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E. W. ja muut (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

(13) Oris, J. T, Belanger, S. C. ja Bailer, A. J. (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370–376.

(14) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariisi.

(15) Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

(16) Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373–1385.

(17) Dunnett, C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(19) Rand, G. M. ja Petrocelli, S. R. (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J. T., Sullivan, J. H. ja Pearson, J. G. (1980), Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

EC_x (*Effect concentration for x % effect*): Pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50} on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan ominaisuuteen altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

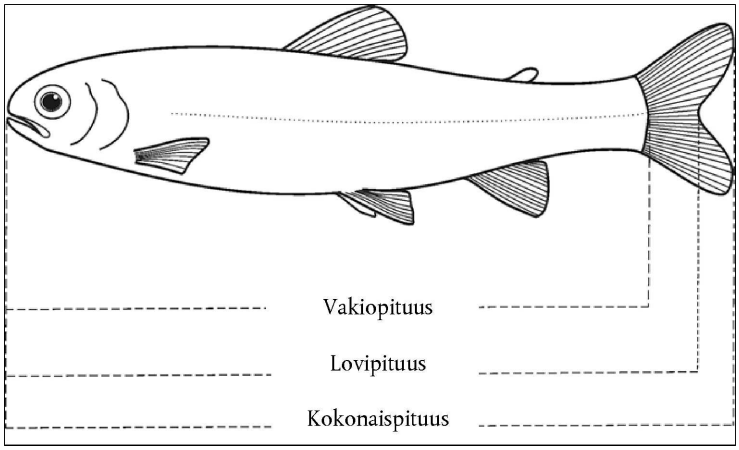
IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*): Kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kokonaispituus: Pituus kuonon kärjestä pyrstöevän pitemmän lohkon kärkeen; mitataan yleensä siten, että lohkot on puristettu keskilinjaa vasten. Kyseessä on suoran viivan mittaus, ruumiin kaarevuutta ei oteta mukaan. (www.fishbase.org)

Kuva 1

Kuvaus käytetyistä pituuksista.



LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalin havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkitsevän vaikutuksen ($p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Lisäyksissä 5 ja 6 annetaan ohjeita.

Lovipituus: Pituus kuonon kärjestä pyrstöevän keskimmäisten ruotojen päähän. Sitä käytetään kaloilla, joilla on vaikea määrittää selkärangan päättymiskohtaa. (www.fishbase.org)

NOEC (*No Observed Effect Concentration*): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): SMILES-järjestelmä. Yksinkertaistettu kemikaalien esitysmuoto.

Testikemikaali tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

UVCB (*Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials*): Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vakiopituus: Kalan pituus mitattuna kuonon kärjestä viimeisen nikaman takareunaan tai pyrstönikamien keskiosan takareunaan. Yksinkertaistettuna tässä mittauksessa pyrstöevän pituus jää pois. (www.fishbase.org)

Lisäys 2

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT SUOSITELLUILLE LAJEILLE

LAJI	TESTAUSOLOSUHTEET			TESTIN SUOSITELTAVA KESTO	Kontrollikalojen kokonaispituuden tyypillinen vähimmäiskeskiarvo tutkimuksen lopussa (mm) (1)	KONTROLLIEN ELOONJÄÄNEISYYS (vähintään)	
	Lämpötila (°C)	Suolapitoisuus (‰)	Valoisa aika (t)			Kuoriutuneisuus	Kuoriutumisen jälkeinen eloonjääneisyys
Makea vesi:							
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	10 ± 1,5 (2)		12–16 (3)	kahden viikon kuluttua siitä, kun kontrollit hakevat itse ruokansa (tai 60 vrk kuoriutumisen jälkeen)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Rasvapäämutu	25 ±1,5		16	32 vrk testin alusta (tai 28 vrk kuoriutumisesta)	18	70 %	75 %
Danio rerio Seeprakala	26 ±1,5		12–16 (4)	30 vrk kuoriutumisesta	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Medaka	25 ±2		12–16 (4)	30 vrk kuoriutumisesta	17	80 %	80 %
Suisto- ja merikalalajit:							
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	25 ± 1,5	15–35 (5)	12–16 (4)	32 vrk testin alusta (tai 28 vrk kuoriutumisesta)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Hopeakylki	22–25	15–35 (5)	13	28 vrk	20	80 %	60 %

Selitykset:

(1) Tyypillinen kokonaispituuden vähimmäiskeskiarvo ei ole validiteettikriteeri, mutta ilmoitetun arvon alapuolella olevat poikkeamat on huolellisesti tutkittava testin herkkyyden kannalta. Kokonaispituuden vähimmäiskeskiarvo on johdettu nykyhetkellä käytettävissä olevien tietojen valikoimasta.

(2) Testattava kirjolohikanta saattaa edellyttää muiden lämpötilojen käyttöä. Siitoskanta on pidettävä samassa lämpötilassa kuin mätimunat. Lyhyt totutus testilämpötilaan on välttämätön sen jälkeen, kun mätimunat on saatu kaupalliselta kasvattajalta (esim. 1–2 t).

(3) Toukat on pidettävä pimeässä yhden viikon ajan kuoriutumisen jälkeen lukuun ottamatta aikoja, jolloin niitä tarkastellaan. Sen jälkeen käytetään koko testin ajan heikkoa valaistusta (valoisa aika 12–16 tuntia) (4).

(4) Valaistusolojen on oltava kaikissa testausolosuhteissa vakaita.

(5) Kaikissa testeissä ± 2 ‰.

Lisäys 3

SUOSITUSLAJIEN SIITOS- JA TESTIELÄINTEN RUOKINTA- JA KÄSITTELYOHJEET

LAJIT	RAVINTO (*)				KUORIUTUMISEN JÄLKEINEN SIIRTOAIKA	AIKA ENSIMMÄISEEN RUOKINTAAN
	Siitoskalat	Vastakuoriutuneet toukat	Juveniilit			
			Tyyppi	Tiheys		
Makea vesi:						
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	Kirjolohen rehu	Ei mitään ([a])	Kirjolohen aloitusrehu BSN	2–4 ruokintaa päivässä	14–16 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida (ei olennaista)	19 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida
Pimephales promelas Rasvapäämutu	BSN, hiutalerehu, FBS	BSN	BSN48, hiutalerehu	2–3 kertaa päivässä	Sen jälkeen, kun kuoriutuneisuus on 90 %	2 vrk kuoriutumisesta
Danio rerio Seeprakala	BSN, hiutalerehu	Kaupallinen toukkarehu, alkueläimiä ([b]), proteiinia ([c])	BSN48, hiutalerehu	BSN kerran päivässä: hiutalerehu kahdesti päivässä	Sen jälkeen, kun kuoriutuneisuus on 90 %	2 vrk kuoriutumisesta
Oryzias latipes Medaka	hiutalerehu	BSN, hiutalerehu (tai alkueläimiä tai rataseläimiä)	BSN48, hiutalerehu (tai rataseläimiä)	BSN kerran päivässä, hiutalerehu kahdesti päivässä tai hiutalerehu ja rataseläimiä kerran päivässä	ei sovelleta	6–7 vrk kudusta
Suisto- ja merikalalajit:						
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	BSN, hiutalerehu FBS	BSN	BSN48	2-3 ruokintaa päivässä	ei sovelleta	1 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida
Menidia sp. Hopeakylki	BSN48, hiutalerehu	BSN	BSN48	2-3 ruokintaa päivässä	ei sovelleta	1 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida

Selitykset:
(*) Ravintoa on annettava niin paljon, että eläimet ovat kylläisiä. Jätteen kertymisen välttämiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on tarvittaessa poistettava.
FBS pakastetut suolalehtijalkaiset; aikuiset Artemia sp
BSN suolalehtijalkaisten naplius-toukat; vasta kuoriutuneet
BSN48 suolalehtijalkaisten nauplius-toukat; 48 tunnin ikäiset
([a]) Ruskuaispussivaiheen toukat eivät tarvitse ravintoa.
([b]) Suodatettu sekaviljelmästä.
([c]) Rakeita käymisprosessista.

Lisäys 4

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Ainesosa	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	l µg/1
Jäännöskloori	l µg/10
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	l µg/1
Arseeni	l µg/1
Kromi	l µg/1
Koboltti	l µg/1
Kupari	l µg/1
Rauta	l µg/1
Lyijy	l µg/1
Nikkeli	l µg/1
Sinkki	l µg/1
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

Lisäys 5

TILASTOLLISIA OHJEITA NOEC-MÄÄRITYKSEEN

Yleistä

Analyysiyksikkö on rinnakkaistankki. Siten jatkuvissa mittauksissa, kuten koon mittauksessa, on laskettava rinnakkaisnäytteen keskiarvo tai mediaani, ja analyysissa käytetään näitä rinnakkaisarvoja. Testien voima on osoitettava mielellään jokaisen laboratorion aiempia riittäviä tuloksia koskevan tietokannan avulla. Käytettävässä tilastollisessa testissä on jokaista tutkittavaa ominaisuutta varten annettava vaikutuksen suuruus, joka voidaan havaita 75–80 prosentin voimalla.

Tämän testausmenetelmän kehittämisajankohtana käytettävissä olevissa tietokannoissa ilmoitetaan mahdollinen voima suositeltavissa tilastomenetelmissä. Yksittäisen laboratorion on osoitettava kykynsä täyttää voimaa koskeva vaatimus joko tekemällä oma voima-analyysi tai osoittamalla, että kunkin vasteen variaatiokerroin ei ylitä testiohjeen laadinnassa käytettyjen variaatiokertoimien 90. prosenttipistettä. Kyseiset variaatiokertoimet esitetään taulukossa 1. Jos käytettävissä ovat ainoastaan rinnakkaisnäytteiden keskiarvot tai mediaanit, rinnakkaisnäytteiden sisäiset variaatiokertoimet voidaan jättää huomiotta.

Taulukko 1

Valikoitujen makean veden lajien 90. prosenttipisteen variaatiokertoimet

Laji	Vaste	Rinnakkaisnäytteiden välinen variaatiokerroin	Rinnakkaisnäytteiden sisäinen variaatiokerroin
Kirjolohi	Pituus	17,4	9,8
	Paino	10,1	28
Rasvapäämutu	Pituus	16,9	13,5
	Paino	11,7	38,7
Seeprakala	Pituus	43,7	11,7
	Paino	11,9	32,8

Lähes kaikissa laboratorioiden toksisuustutkimusten arvioinnissa käytettävissä tilastollisissa testeissä kiinnostuksen kohteena on vertailla käsittelyryhmiä kontrolleihin. Tästä syystä ei ole asianmukaista vaatia merkitsevää ANOVA-F-testiä, ennen kuin käytetään Dunnettin tai Williamsin testiä, taikka merkitsevää Kruskal-Wallisin testiä, ennen kuin käytetään Jonckheere-Terpstran, Mann-Whitneyn tai Dunnin testiä (Hochberg ja Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson ja muut 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnettin testiin on etukäteen määritetty kerrannaisuuskorjaus, jolloin sen väärien positiivisten ja väärien negatiivisten tulosten osuuksiin vaikuttaa haitallisesti F-testin käyttäminen portinvartijana. Vastaavasti Williamsin ja Jonckheere-Terpstran vertailutesteissä, joissa käytetään 0,05:n merkitsevyystasoa jokaisessa vaiheessa, väärien positiivisten tulosten kokonaisosuus pysyy 5 prosentissa, mihin, samoin kuin testien voimaan, vaikuttaa haitallisesti F-testin tai Kruskal-Wallisin testin käyttäminen portinvartijana. Mann-Whitneyn ja Dunnin testejä on korjattava kerrannaisuuden osalta, ja siihen suositellaan Bonferroni-Holmin korjausta.

OECD:n julkaisussa (2006) käsitellään hypoteesitestausta ja testien perustana olevien olettamusten todentamista koskevia suosituksia yksityiskohtaisesti, ja siinä on myös laaja kirjallisuusluettelo.

Kontrollien käsittely liuottimen yhteydessä

Jos käytetään liuotinta, testiin on otettava sekä laimennusvesikontrolli että liuotinkontrolli. Näitä kahta kontrollia on verrattava jokaisen vasteen osalta, ja tulokset on yhdistettävä tilastollista analyysia varten, ellei kontrollien välillä ole merkitsevää eroa. Muutoin NOEC:n määritykseen tai EC_x:n estimointiin on käytettävä liuotinkontrollia, eikä vesikontrollia käytetä. Ks. rajoitus validiteettikriteereissä (7 kohta).

T-testiä tai Mann-Whitneyn testiä on käytettävä vertaamaan laimennusvesikontrollia ja liuotinkontrollia pituuden, painon, kuoriutuneisuuden, toukkakuolleisuuden tai epänormaalien toukkien osuuden sekä kuoriutumisen ensimmäisen ja viimeisen päivän tai uimaan lähdön osalta 0,05:n merkitsevyystasolla ottamatta käsittelyryhmiä huomioon. Näiden testien tulokset on raportoitava.

Kokomittaukset (pituus ja paino)

Yksittäisten kalojen pituus- ja painoarvot voivat olla normaali- tai log-normaalijakaumalla. Kummassakin tapauksessa rinnakkaisnäytteiden keskiarvot ovat yleensä normaalijakaumalla keskeisen raja-arvolauseen nojalla, mikä on vahvistettu runsaasti yli 100 ELS-tutkimuksessa kolmella makean veden lajilla. Vaihtoehtoisesti, jos tiedot tai aiemmat tietokannat viittaavat yksittäisten kalojen kokoarvojen log-normaalijakaumaan, voidaan laskea yksittäisten kalojen arvojen rinnakkaisnäytteiden logaritminen keskiarvo, minkä jälkeen analyysitietoja voidaan käyttää rinnakkaisnäytteiden logaritmisen keskiarvon anti-logina.

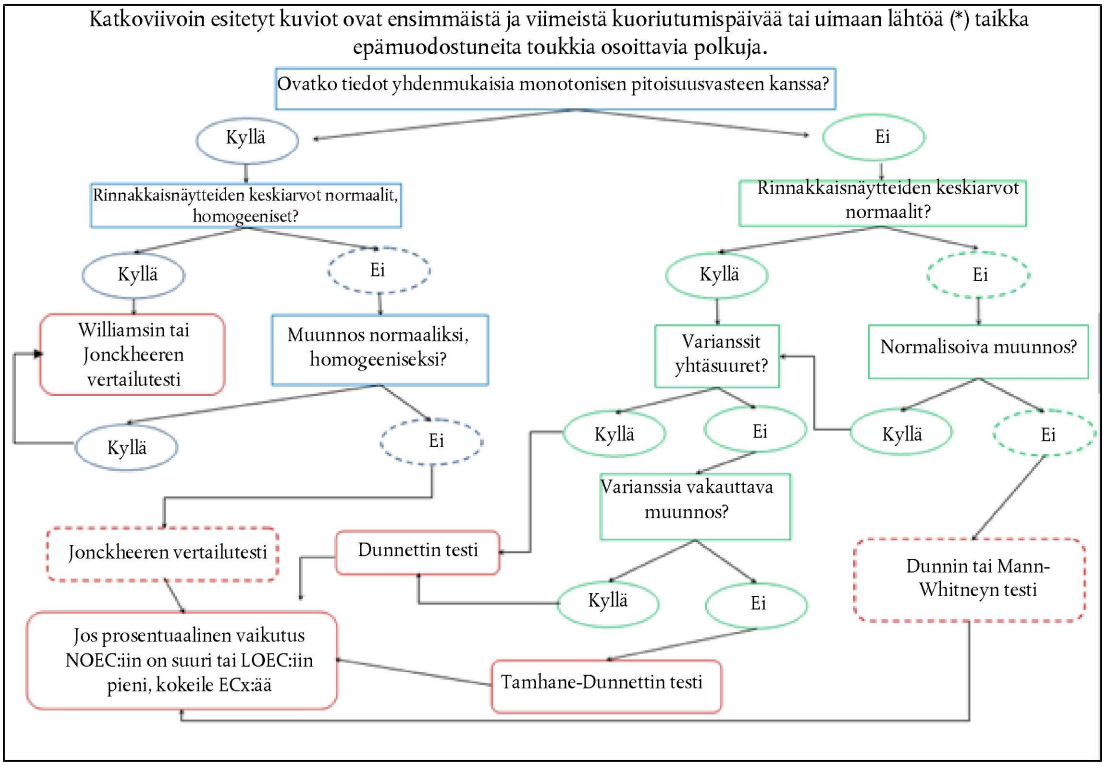
Tietojen yhdenmukaisuus normaalijakauman ja varianssien homogeenisuuden kanssa on arvioitava. Tätä varten on käytettävä ANOVA-mallin jäännöksiä siten, että pitoisuudet ovat ainoa selittävä luokkamuuttuja. Visuaalista määritystä hajontakaavioiden ja pylväsdiagrammien tai lehti-ruoti-kuvioiden avulla voidaan käyttää. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää virallista testiä, kuten Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testiä. Yhdenmukaisuus varianssien homogeenisuuden kanssa voidaan arvioida samasta hajontakaaviosta visuaalisesti tai virallisesti Levenen testillä. Vain parametritesteissä (kuten Williams, Dunnett) on arvioitava normaalius tai varianssien homogeenisuus.

Mahdollisiin poikkeaviin havaintoarvoihin ja niiden vaikutukseen analyysissa on kiinnitettävä huomiota. Tukeyn poikkeavien havaintoarvojen testiä ja samojen edellä kuvattujen jäännöskaavioiden visuaalista tarkastelua voidaan käyttää. On muistettava, että havainnot koskevat kokonaisia rinnakkaisnäytteitä, joten poikkeavan havaintoarvon pois jättäminen analyysistä on tehtävä vasta huolellisen harkinnan jälkeen.

Tilastolliset testit, joissa hyödynnetään testijärjestelyn ominaispiirteitä ja biologisia odotuksia, ovat alaspäin askeltavia trenditestejä, kuten Williams ja Jonckheere-Terpstra. Testeissä on oletuksena monotoninen pitoisuus-vaste, ja on arvioitava, ovatko tiedot yhdenmukaisia tämän olettaman kanssa. Se voidaan tehdä visuaalisesti rinnakkaisnäytteiden keskiarvojen hajontakaaviosta verrattuna testipitoisuuteen. On avuksi asettaa hajontakaavion päälle paloittain lineaarinen kaavio, jossa yhdistetään rinnakkaisnäytteen näytekoolla painotetut pitoisuuden keskiarvot. Jos paloittainen lineaarinen kaavio poikkeaa suuresti monotonisuudesta, on ehkä tarpeen käyttää muita kuin trenditestejä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää virallisia testejä. Yksinkertainen virallinen testi on laskea pitoisuuskeskiarvojen lineaariset ja kvadraattiset kontrastit. Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti ei, se on merkki mahdollisesta monotonisuusongelmasta, jota on arvioitava kaavioista tarkemmin. Jos normaalius tai varianssien homogeenisuus voi olla ongelma, kontrastit voidaan konstruoida sijatunnusmuunnetuista tiedoista. Vaihtoehtoisia menettelyjä, kuten Bartholomewin monotonisuustestiä, voidaan käyttää, mutta ne lisäävät kompleksisuutta.

Kuva 2

NOEC-vuokaavio koon mittauksista (pituus ja paino).



(*) Nämä vasteet eivät koskaan vastaa parametrianalyysin tai -mallin oletuksia.

Paitsi jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia näitä testejä koskevien vaatimusten kanssa, NOEC määritetään soveltamalla alaspäin askeltavia Williamsin tai Jonckheere-Terpstran testejä. OECD:n julkaisussa (2006) annetaan näistä menettelyistä yksityiskohtaiset tiedot. Jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia alaspäin askeltavien testien vaatimusten kanssa, voidaan käyttää Dunnettin testiä tai Tamhane-Dunnettin testiä (T3), joissa kummassakin on etukäteen määritetyt kerrannaisuuskorjaukset. Näissä testeissä oletuksena on normaalius ja Dunnettin tapauksessa varianssien homogeenisuus. Jos kyseiset edellytykset eivät täyty, voidaan käyttää Dunnin parametritonta testiä. OECD:n julkaisussa (2006) on yksityiskohtaiset tiedot kaikista näistä testeistä. Kuvassa 2 on yleiskatsaus testin valintaan.

Mätimunien kuoriutuminen ja toukkien eloonjääminen

Tiedot koskevat kuoriutuvien mätimunien tai eloonjäävien toukkien osuuksia yksittäisissä rinnakkaisnäytteissä. Osuuksista on arvioitava ylihajonta, joka on tavallista muttei vallitsevaa tällaisissa mittauksissa. Kuvan 3 vuokaaviossa on ohjeita testin valintaan; yksityiskohtaiset kuvaukset on annettu tekstissä.

Kahta testiä käytetään yleisesti. Ne ovat Taronen C(α)-testi (Tarone 1979) ja Khin neliö -testi, joita kumpaakin sovelletaan erikseen jokaiseen testipitoisuuteen. Jos ylihajontaa löydetään yhdessäkin testipitoisuudessa, on käytettävä menetelmiä, joissa se voidaan ottaa huomioon.

Kaava 1

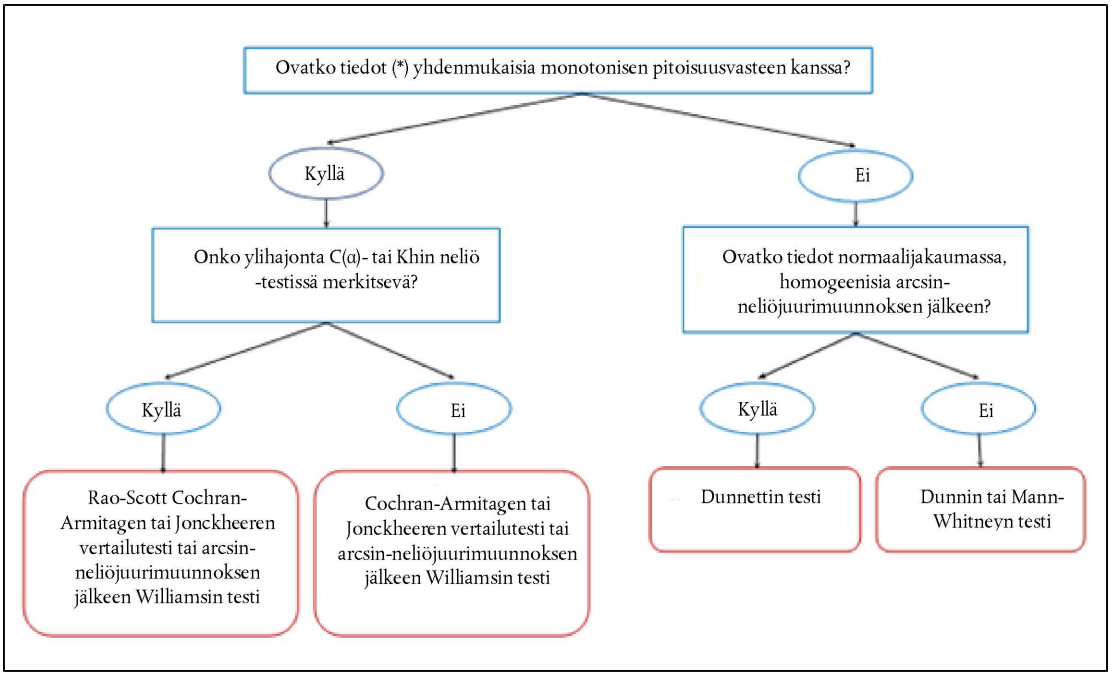
Taronen C(α)-testi (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

jossa $\hat{p}$ on tietyn pitoisuuden keskimääräinen osuus, **m** on rinnakkaistankkien lukumäärä, $\mathbf{n_j}$ on kohteiden lukumäärä rinnakkaisnäytteessä **j**, ja $\mathbf{x_j}$ on kyseisessä rinnakkaisnäytteessä vasteen antavien eli esim. kuoriutumattomien tai kuolleiden kohteiden lukumäärä. Testiä sovelletaan kuhunkin pitoisuuteen erikseen. Testiä voidaan pitää Khin neliö -testin sovelluksena, mutta rajoitetulla voimalla Taronella tehdyt simulaatiot ovat osoittaneet, että se on tehokkaampi kuin Khin neliö -testi.

Kuva 3

NOEC-vuokaavio. Mätimunien kuoriutuminen ja toukkakuolleisuus.



(*) Tiedot koskevat rinnakkaisnäytteiden osuuksia.

Jos ylihajonnasta ei ole merkitsevää näyttöä, voidaan käyttää Cochran-Armitagen vertailutestiä. Tässä testissä rinnakkaisnäytteitä ei oteta huomioon, joten jos ylihajonnasta on näyttöä, suositellaan Cochran-Armitagen testin Rao-Scott-korjausta (RSCA), jossa rinnakkaisnäytteet, rinnakkaisnäytekoot ja ylihajonta otetaan huomioon. Vaihtoehtoisia testejä ovat muun muassa Williamsin ja Jonckheere-Terpstran vertailutestit ja Dunnettin testi, kuten edellä on kuvattu koon mittauksissa. Näitä testejä sovelletaan ylihajonnasta riippumatta, mutta niiden voima on hieman alhaisempi (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao ja Scott 1992, 1999, Fung ja muut 1994, 1996).

Ensimmäinen tai viimeinen kuoriutumispäivä tai uimaan lähtö

Vaste on kokonaisluku, joka ilmoittaa testipäivän, jona mainitut havainnot on tehty tietyssä rinnakkaistankissa. Arvojen vaihteluväli on yleensä hyvin rajoitettu, ja toisiinsa sidottujen arvojen osuus on usein hyvin suuri. Esimerkiksi sama ensimmäinen kuoriutumispäivä havaitaan kaikissa rinnakkaiskontrolleissa ja ehkä yhdessä tai kahdessa alhaisen testipitoisuuden näytteessä. Parametritestitestit, kuten Williams ja Dunnett, eivät sovellu tällaisten tietojen käsittelyyn. Jonckheere-Terpstran vertailutestillä havaitaan erittäin tehokkaasti testikemikaalin vaikutukset, ellei ole näyttöä vakavasta monotonisuuden puutteesta. Muussa tapauksessa voidaan käyttää Dunnin testiä.

Toukkien epämuodostumat

Vaste on jollain lailla epänormaaleiksi todettujen toukkien lukumäärä. Vaste on usein hyvin alhainen, ja siihen liittyy joitakin samoja ongelmia kuin ensimmäiseen kuoriutumispäivään, ja toisinaan pitoisuusvaste on epäsäännöllinen. Jos tiedot ainakin pääpiirteittäin noudattavat monotonista pitoisuusmuotoa, testikemikaalin vaikutukset havaitaan erittäin tehokkaasti Jonckheere-Terpstran vertailutestillä. Muussa tapauksessa voidaan käyttää Dunnin testiä.

VIITTEET

Agresti, A. (2002), Categorical Data Analysis, 2. laitos, Wiley, Hoboken.

Dunnett, C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of American Statistical Association, 50, 1096–1121.

Dunn, O. J. (1964), Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241–252.

Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482–491.

Fung, K. Y., Krewski, D., Rao, J. N. K., Scott, A. J. (1994), Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639–648.

Fung, K. Y, Krewski, D., Smythe, R. T. (1996), A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431–454.

Hochberg, Y. ja Tamhane, A. C. (1987), Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J. C. (1996), Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A. R. (1954), A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B. J. T. (1992), Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Lontoo.

OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Pariisi.

Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373–1385.

Robertson, T., Wright, F. T. ja Dykstra, R. L. (1988), Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R. E. (1979), Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585–590.

Williams, D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103–117.

Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519–531.

Williams, D. A. (1975), The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949–952.

Williams, D. A. (1977), Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9–14.

Lisäys 6

REGRESSIOESTIMAATTEJA KOSKEVIA TILASTOLLISIA OHJEITA

Yleistä

Mallin sovittamiseen käytettäviä havaintoja ovat rinnakkaisnäytteiden keskiarvot (pituus ja paino) tai rinnakkaisnäytteiden suhteelliset osuudet (mätimunien kuoriutuminen ja toukkakuolleisuus) (OECD 2006).

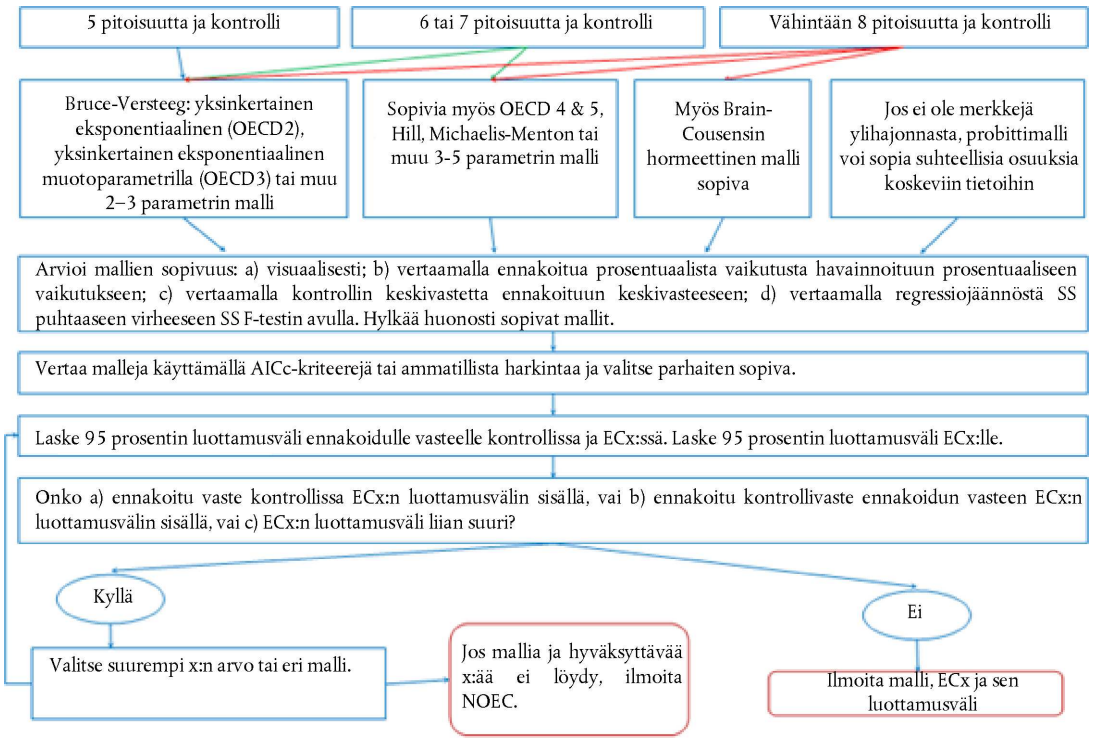
Yleisesti suositellaan painotettua regressiota, jossa painona käytetään rinnakkaisnäytteen näytekokoa. Muut painotusjärjestelmät ovat mahdollisia, kuten painotus ennakoidulla keskivasteella tai sen ja rinnakkaisnäytteen näytekoon yhdistelmällä. Painotusta saman pitoisuuden sisäisen näytteen varianssin käänteisluvulla ei suositella (Bunke ja muut 1999, Seber ja Wild 2003, Motulsky ja Christopoulos 2004, Huet ja muut 2003).

Jos vasteita muunnetaan ennen analyysia, on säilytettävä havaintojen riippumattomuus, ja ECx ja sen luottamusrajat on ilmaistava alkuperäisinä mittayksiköinä eikä muunnettuina yksiköinä. Esimerkiksi 20 prosentin muutos pituuden logaritmissa ei vastaa 20 prosentin muutosta pituudessa (Lyles ja muut 2008, Draper ja Smith 1999).

Kuvan 4 kaaviossa esitetään yleiskatsaus ECx-estimaatteihin. Yksityiskohdat esitetään jäljempänä.

Kuva 4

Vuokaavio – rinnakkaisnäytteiden keskipituuden tai -painon taikka mätimunien kuoriutumisosuuden tai toukkakuolleisuuden EC_x-estimointi, ks. tarkemmin jäljempänä.



Mätimunien kuoriutumista ja toukkakuolleisuutta koskevia näkökohtia

Mätimunien kuoriutumiseen ja toukkakuolleisuuteen on yleensä paras sovittaa alenevaa mallia, ellei soviteta jäljempänä kuvattua probittimallia. On toisin sanoen mallinnettava kuoriutumatta jääneiden mätimunien tai kuolevien toukkien osuutta. Tämä johtuu siitä, että EC_x viittaa pitoisuuteen, jossa muutos on x prosenttia kontrollin keskivasteesta. Jos kontrollimunista 5 prosenttia jää kuoriutumatta ja mallinnetaan kuoriutumatta jäämistä, EC_{20} viittaa pitoisuuteen, jossa muutos on 20 prosenttia kontrollien 5 prosentin kuoriutumatta jäämisestä, jolloin muutos on 0,2 × 0,05 = 0,01. Toisin sanoen kuoriutumatta jääneitä on 1 prosenttiyksikköä eli 6 prosenttia. Näin pientä muutosta ei voida mielekkäästi estimoida käytettävissä olevista tiedoista eikä se ole biologisesti merkitsevä. Jos sen sijaan mallinnetaan niiden mätimunien osuutta, jotka kuoriutuvat, kontrolliosuus on tässä esimerkissä 95 prosenttia, ja 20 prosentin vähennys kontrollin keskiarvosta vastaa muutosta 0,95 × 0,2 = 0,18, joten 95 prosentin kuoriutumismenestys muuttuu 77 prosentiksi (= 95 − 18). Tällöin pitoisuuden vaikutus voidaan estimoida, joten menetelmällä on oletettavasti enemmän arvoa. Kokomittauksissa tämä ei ole ongelma, vaikka haitalliset vaikutukset kokoon tarkoittavat yleensä koon pienenemistä.

Kokoa (pituutta tai painoa) ja mätimunien kuoriutumismenestystä tai toukkien eloonjääntiä koskevat mallit

Kaikki mallit on kuvattu ja niitä suositellaan OECD:n julkaisussa (2006), Brain-Cousensin hormeettista mallia lukuun ottamatta. Niin sanottuja OECD 2–5 -malleja käsitellään ekotoksisuustestien yhteydessä myös Slobin teoksessa (2002). Mahdollisesti hyödyllisiä malleja on luonnollisesti muitakin. Teoksessa Bunke ja muut (1999) luetellaan useita malleja, joita ei käsitellä tässä, ja muita malleja koskevia viitteitä on runsaasti. Jäljempänä ehdotettuja malleja pidetään erityisen hyvin sopivina ekotoksisuustesteihin, ja niitä käytetään laajalti.

5 testipitoisuutta ja kontrolli

— Bruce-Versteeg

— Yksinkertainen eksponentiaalinen (OECD 2)

— Eksponentiaalinen muotoparametrilla (OECD 3)

— Yksinkertainen eksponentiaalinen alarajalla (OECD 4)

Vähintään 6 testipitoisuutta ja kontrolli

— Eksponentiaalinen muotoparametrilla ja alarajalla (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Jos hormeesista on visuaalista näyttöä (epätodennäköistä mätimunien onnistuneen kuoriutumisen tai toukkien eloonjäännin yhteydessä, mutta kokohavainnoissa sitä havaitaan toisinaan)

— Brain-Cousens hormeettinen; (Brain ja Cousens 1989)

Mätimunien kuoriutumisen epäonnistumista ja toukkakuolleisuutta koskevia vaihtoehtoisia malleja

— Näitä vasteita koskevat ylenevät mallit voidaan sovittaa probitti- (tai logistisilla) malleilla, ellei ylihajonnasta ole näyttöä ja kontrolli-ilmaantuvuus estimoidaan sovitetussa mallissa. Tämä ei ole parhaana pidetty menetelmä, koska siinä analyysiyksikkönä pidetään yksilöä, ei rinnakkaisnäytettä (Morgan 1992, O'Hara Hines ja Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Yhden ainoan mallin sopivuus

— Verrataan havaittua ja ennakoitua prosentuaalista pienenemistä visuaalisesti kussakin testipitoisuudessa (Motulsky ja Christopoulos 2004, Draper ja Smith 1999).

— Verrataan regressiokeskineliövirhettä puhtaaseen keskineliövirheeseen käyttämällä F-testiä (Draper ja Smith 1999).

— Tarkistetaan, että mallin jokainen tekijä poikkeaa merkitsevästi nollasta (ts. on määritettävä, ovatko mallin kaikki tekijät merkittäviä) (Motulsky ja Christopoulos 2004).

— Regressiojäännöskaaviot v. testipitoisuus, mahdollisesti log(pitoisuus)-asteikolla. Kaaviolla ei pitäisi olla kaavaa; pisteiden on oltava satunnaisesti siroteltuna vaakasuoran viivan ympärille nollan korkeudella.

— Tietojen normaalius ja varianssien homogeenisuus on arvioitava lisäyksessä 5 esitetyllä tavalla.

— Arvioidaan lisäksi regressiomallin jäännösten normaalius käyttämällä samoja menetelmiä kuin lisäyksessä 5 esitetään ANOVA-jäännöksille.

Mallien vertailu

— Käytetään Akiaken korjattua informaatiokriteeriä (AICc). Pienet AICc-arvot ovat merkki hyvästä sopivuudesta, ja jos AICc(B) − AICc(A) ≥ 10, malli A on lähes varmasti parempi kuin malli B (Motulsky ja Christopoulos (2004).

— Verrataan kahta mallia visuaalisesti, jotta nähdään, kuinka hyvin ne täyttävät edellä annetut yhtä ainoaa mallia koskevat kriteerit.

— Parsimoniaperiaate on suositeltava; sen mukaan käytetään yksinkertaisinta mallia, joka soveltuu tietoihin kohtuullisen hyvin (Ratkowsky 1993, Lyles ja muut 2008).

EC_x-estimaatin laatu

EC_x:n luottamusväli ei saa olla liian suuri. Tilastollista harkintaa tarvitaan sen ratkaisemiseen, kuinka suuri luottamusväli voi olla, jotta EC_x on edelleen hyödyllinen. Mätimunien kuoriutumis- ja kokotietoihin sovitetuilla regressiomalleilla tehdyt simulaatiot osoittavat, että EC_x:n (x = 10, 20 tai 30) 75 prosentin luottamusväli ulottuu enintään kahteen testipitoisuuteen. Näin saadaan yleisohje siitä, mikä on hyväksyttävää, ja käytännön ohje siitä, mikä on saavutettavissa. Lukuisat kirjoittajat vahvistavat tarpeen ilmoittaa kaikkien parametrien luottamusvälit ja sen, että malliparametrien suuret luottamusvälit ovat merkki malleista, joita ei voida hyväksyä (Ott ja Longnecker 2008, Alvord ja Rossio 1993, Motulsky ja Christopoulos 2004, Lyles ja muut 2008, Seber ja Wild 2003, Bunke ja muut 1999, Environment Canada 2005).

EC_x:n (tai minkään muun malliparametrin) luottamusväli ei saa sisältää nollaa (Motulsky ja Christopoulos (2004). Tämä on pienintä merkitsevää eroa vastaava regressio, joka mainitaan usein hypoteesitestausmenetelmissä (esim. Wang ja muut 2000). Se vastaa myös keskiarvovasteita LOEC-arvossa, joka ei sisällä kontrollikeskiarvoa. Parametriestimaattien tieteellistä uskottavuutta on pohdittava. Jos esim. y0:n luottamusväli on ± 20 prosenttia, mikään EC_{10}-estimaatti ei ole uskottava. Jos mallissa ennakoidaan 20 prosentin vaikutus pitoisuudella C ja C:n ja sitä pienemmillä pitoisuuksilla havaittu maksimivaikutus on 10 prosenttia, EC_{20} ei ole uskottava (Motulsky ja Christopoulos 2004, Wang ja muut 2000, Environment Canada 2005).

EC_x:n määrittäminen ei saa edellyttää ekstrapolointia positiivisten pitoisuuksien vaihteluvälin ulkopuolella (Draper ja Smith 1999, OECD 2006). Yleisohjeena voidaan esimerkiksi pitää, että EC_x on enintään 25 prosenttia pienimmän testatun pitoisuuden alapuolella tai suurimman testatun pitoisuuden yläpuolella.

VIITTEET

Alvord, W. G., Rossio, J. L. (1993), Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155–163.

Brain, P. ja Cousens, R. (1989), An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93–96.

Bunke, O., Droge, B. ja Polzehl, J. (1999), Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197–240.

Collett, D. (2002), Modelling Binary Data, 2. laitos, Chapman and Hall, Lontoo.

Collett, D. (2003), Modelling Survival Data in Medical Research, 2. laitos, Chapman and Hall, Lontoo.

Draper, N. R. ja Smith, H. (1999), Applied Regression Analysis, 3. laitos. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005), Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46.

Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., Jolivet, E. (2003), Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M. ja Cooper, C. R. (2008), Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*, marraskuu 2008, 29(6): 878–886.

Morgan, B. J. T. (1992), Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Lontoo.

Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004), Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. ja Lawless, J. F. (1993), Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* nide 49, s. 107–121.

OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Pariisi.

Ott, R. L., Longnecker, M. T. (2008), An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 6. laitos, Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D. A. (1993), Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195–199.

Seber, G. A. F., Wild, C. J. (2003), Nonlinear Regression, Wiley.

Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298–312.

Wang, Q., Denton, D. L. ja Shukla, R. (2000), Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, nide 19, s. 113–117, 2000.

C.48 **Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 229 (2012). Oli tarpeen kehittää ja validoida kalatutkimus, jolla pystytään havaitsemaan hormonitoimintaan vaikuttavia kemikaaleja, koska kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille kemikaalien ja hormonijärjestelmän välisen vuorovaikutuksen vuoksi. Vuonna 1998 OECD aloitti ensisijaisena toimenpiteenä olemassa olevien ohjeiden uudistamisen ja uusien ohjeiden laatimisen mahdollisten hormonitoimintaa häiritsevien aineiden seulontaa ja testausta varten. Yksi toimenpiteen osa oli laatia testiohjeet kalojen hormonijärjestelmään vaikuttavien kemikaalien seulontaan. Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus on hyväksytty laaja-alaisessa validointiohjelmassa. Siihen sisältyi laboratorioiden välisiä tutkimuksia tietyillä kemikaaleilla, ja tutkimusten tavoitteena oli osoittaa määritysmenetelmän tarkkuus ja luotettavuus sellaisten kemikaalien havaitsemisessa, jotka vaikuttavat kalojen lisääntymiseen eri mekanismeilla, mukaan luettuina hormonijärjestelmään kohdistuvat vaikutustavat (1, 2, 3, 4, 5). Kaikki OECD:n testiohjeessa mainitut tutkittavat ominaisuudet on validoitu rasvapäämudulla, ja osa ominaisuuksista on validoitu medakalla (ts. vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet) ja seeprakalalla (vitellogeniini). Validoinnin vertaisarvioi osittain asiantuntijaryhmä, jonka nimittivät testiohjeohjelman kansalliset koordinaattorit (6), ja riippumaton asiantuntijaryhmä Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston toimeksiannosta (29). Määritysmenetelmää ei ole tarkoitettu erityisesti hormonitoimintaa häiritsevien mekanismien tunnistamiseen, sillä koe-eläimillä on ehjä hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli). Se saattaa reagoida kemikaaleihin, jotka vaikuttavat HPG-akseliin eri pitoisuuksilla.

2. Tässä testimenetelmässä kuvataan *in vivo* -seulontamenetelmä, jossa sukukypsiä koiraskaloja ja kutevia naaraskaloja pidetään yhdessä ja altistetaan kemikaalille tietyn ajan niiden elinkaaresta (21 päivää). Kahdenkymmenenyhden päivän pituisen altistusjakson lopussa koirailta ja naarailta mitataan kaksi biomarkkeriominaisuutta, joita pidetään indikaattoreina testikemikaalin hormonijärjestelmään kohdistuvasta vaikutuksesta; mitattavat ominaisuudet ovat vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet. Vitellogeniini mitataan rasvapäämudulta, medakalta ja seeprakalalta, kun taas sekundaariset sukupuoliominaisuudet mitataan rasvapäämudulta ja medakalta. Lisäksi määrällistä hedelmällisyyttä seurataan päivittäin koko testin ajan. Myös sukurauhaset säilytetään, ja histopatologia voidaan arvioida testieläinten lisääntymiskunnon arvioimiseksi ja muiden tutkittavien ominaisuuksien todistusarvon lisäämiseksi.

3. Tämä biotesti on lisääntymiskyvyn *in vivo* -seulontatesti ja sen soveltamista on tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevaa OECD:n käsitekehystä (*OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (30). Tässä käsitekehyksessä kalojen lyhytaikaista lisääntymistutkimusta ehdotetaan tasolla 3 in vivo -tutkimuksena, joka antaa tietoa valikoiduista hormonijärjestelmän mekanismeista/reiteistä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

4. Munimalla lisääntyvien selkärankaisten naaraiden maksa tuottaa yleensä vitellogeniinia (VTG) verenkierrossa olevan endogeenisen estrogeenin avulla. Se on munankeltuaisen proteiinien esiaste, ja kun maksa on tuottanut sitä, se kulkeutuu verenkierrossa munasarjoihin, joissa kehittyvät munasolut ottavat sen sisäänsä ja muokkaavat sitä. Epäkypsien naaras- ja koiraskalojen plasmassa vitellogeniinia on lähes mahdoton havaita, koska niillä ei ole riittävästi estrogeenia verenkierrossaan. Maksa voi kuitenkin syntetisoida ja erittää vitellogeniinia eksogeenisen estrogeenistimulaation avulla.

5. Vitellogeniinin mittauksella voidaan havaita kemikaaleja, joilla on erilaisia estrogeeniin liittyviä vaikutustapoja. Estrogeeniin vaikuttavien kemikaalien havaitseminen on mahdollista mittaamalla vitellogeniinin kehittymistä koiraskaloissa, ja sitä on dokumentoitu runsaasti tieteellisessä vertaisarvioidussa kirjallisuudessa (esimerkiksi (7)). Vitellogeniinin kehittymistä on osoitettu myös aromatisoituville androgeeneille altistumisen jälkeen (8, 9). Naaraskalojen verenkierron estrogeenipitoisuus pienentyy esimerkiksi, kun aromataasia estetään muuntamasta endogeenista androgeenia luonnolliseksi estrogeeniksi, 17β-estradioliksi. Tällöin myös vitellogeniinitaso laskee, ja tätä käytetään aromataasia estäviä ominaisuuksia sisältävien kemikaalien havaitsemiseen (10, 11). Estrogeenin/aromataasin estämisen aiheuttaman vitellogeniinivasteen biologinen merkityksellisyys on osoitettu, ja se on dokumentoitu laajalti. On kuitenkin mahdollista, että vitellogeniinin tuotantoon naarailla voivat vaikuttaa myös yleinen toksisuus ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus).

6. Useita mittausmenetelmiä on kehitetty onnistuneesti, ja ne on myös vakioitu rutiinikäyttöön. Esimerkkinä tästä ovat lajikohtaiset entsyymivälitteiset immunosorbenttimääritysmenetelmät (ELISA), joissa vitellogeniinin määrä määritetään immunokemian avulla yksittäisiltä kaloilta otetuista veri- tai maksanäytteistä (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Rasvapäämudun verestä, seeprakalan verestä tai pään/pyrstön homogenaatista sekä medakan maksasta otetaan näytteitä vitellogeniinin mittausta varten. Medakalla verestä ja maksasta mitattujen vitellogeniiniarvojen välinen korrelaatio on hyvä (19). Lisäyksessä 6 on esitetty suositeltavat näytteenottomenetelmät vitellogeniinianalyysia varten. Vitellogeniinin mittaukseen tarkoitettuja testipaketteja on saatavilla laajalti, ja niiden on perustuttava validoituun lajikohtaiseen ELISA-menetelmään.

7. Tiettyjen lajien koiraskaloilla sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat ulkoisesti näkyviä, ja ne ovat kvantifioitavissa ja vastaavat verenkierron endogeenisten androgeenien pitoisuutta rasvapäämudulla ja medakalla mutta eivät seeprakalalla, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Naarailla on kyky kehittää koiraan sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, kun ne altistuvat androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille vedessä. Tieteellisessä kirjallisuudessa on useita tutkimuksia, joissa dokumentoidaan tämäntyyppisestä vasteesta rasvapäämudulla (20) ja medakalla (21). Koiraskalojen sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien vähenemisen tulkinnassa on syytä olla varovainen heikon tilastollisen voiman takia, ja sen on perustuttava asiantuntijan arvioon ja näyttöön perustuvaan toimintatapaan. Seeprakalan käyttöön tässä määrityksessä liittyy rajoituksia, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, jotka reagoivat androgeenisesti vaikuttaviin kemikaaleihin.

8. Rasvapäämudulla eksogeenisen androgeenialtistuksen pääindikaattori on naaraskalan kuonossa sijaitsevien kutukyhmyjen lukumäärä. Medakalla tärkein merkki eksogeenisesta altistumisesta androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille on naaraskalojen sukuelinpapillien lukumäärä. Lisäyksissä 5A ja 5B esitetään suositeltavat menetelmät rasvapäämudun ja medakan sukupuoliominaisuuksien arvioimiseksi.

9. Kahdenkymmenenyhden päivän kalatutkimukseen sisältyy määrällisen mätimunatuotannon arviointi ja sukurauhasten säilyttäminen valinnaista histopatologista tutkimusta varten. Jotkin sääntelyviranomaiset saattavat vaatia tätä lisäominaisuutta tutkittavaksi, jotta testieläinten lisääntymiskuntoa voidaan arvioida täydellisesti, tai tapauksissa, joissa vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet eivät vastaa kemiallista altistusta. Vaikka jotkin tutkittavat ominaisuudet saattavat olla erittäin diagnosoivia (kuten vitellogeniinin indusointi uroksissa ja kyhmyjen muodostuminen naaraissa), kaikkien tutkittavien ominaisuuksien ei ole tarkoitus riidattomasti tunnistaa tiettyjä solunsisäisiä toimintamekanismeja. Pikemminkin kaikki tutkittavat ominaisuudet yhdessä antavat mahdollisuuden päätellä, että hormonijärjestelmään saattaa kohdistua häiriöitä, ja sitä kautta saadaan ohjausta jatkotestauksiin. Vaikka hedelmällisyys ei liity yksinomaan hormonijärjestelmään, se on tärkeä tutkittava ominaisuus, koska sen on osoitettu reagoivan herkästi tunnettuihin hormonijärjestelmään vaikuttaviin kemikaaleihin (5). Jos kemikaali ei vaikuta hedelmällisyyteen ja muihin ominaisuuksiin, voidaan suhtautua luottavaisemmin siihen, että yhdiste ei todennäköisesti vaikuta hormonijärjestelmään. Jos kemikaali kuitenkin vaikuttaa hedelmällisyyteen, se lisää voimakkaasti päättelyn todistusarvoa. Jäljempänä tässä testimenetelmässä annetaan ohjeita tietojen tulkintaa ja testitulosten hyväksymistä varten.

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

11. Lisääntymistilassa olevat koiras- ja naaraskalat altistetaan testiastioissa yhdessä. Kumpikin sukupuoli voidaan erottaa selvästi aikuisuuden ja lisääntymistilan perusteella, joten kukin tutkittava ominaisuus voidaan analysoida sukupuolikohtaisesti, ja myös sukupuolikohtainen herkkyys eksogeenisille kemikaaleille voidaan selvittää varmasti. Testin päätteeksi sukupuoli vahvistetaan sukurauhasten makroskooppisella tutkimuksella, joka tehdään avaamalla kala saksilla vatsan puolelta. Yhteenveto biologisen testin oleellisista olosuhteista on lisäyksessä 2. Yleensä testi aloitetaan kalalla, joka on otettu kutuikäisestä populaatiosta; vanhoja kaloja ei pidä käyttää. Ohjeita kalan iän ja lisääntymistilan selvittämiseen on kohdassa Kalan valinta. Testi tehdään käyttäen

kolmea kemikaalialtistuksen pitoisuutta ja vesikontrollia sekä tarvittaessa liuotinkontrollia. Seeprakalan kanssa käytetään kahta astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää viisi koirasta ja viisi naarasta). Rasvapäämudun kanssa käytetään neljää astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää kaksi koirasta ja neljä naarasta). Tällä tavalla voidaan ottaa huomioon rasvapäämutukoiraan reviirikäyttäytyminen ja samalla säilyttää testin riittävä voima. Medakan kanssa käytetään neljää astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää kolme koirasta ja kolme naarasta). Altistusta jatketaan 21 päivää, ja kaloista otetaan näytteet altistuksen 21. päivänä. Määrällistä hedelmällisyyttä seurataan päivittäin.

12. Kalat lopetetaan humaanilla tavalla 21. päivänä tehtävän näytteenoton yhteydessä. Sekundaariset sukupuoliominaisuudet mitataan rasvapäämudulta ja medakalta (ks. lisäykset 5A ja 5B). Verinäytteet vitellogeniinin määrittämiseksi otetaan seeprakalalta ja rasvapäämudulta; vaihtoehtoisesti seeprakalalta voidaan ottaa pää/pyrstö vitellogeniinin määrittämistä varten (lisäys 6). Medakalta otetaan maksa vitellogeniinianalyysia varten (lisäys 6). Sukurauhaset kiinnitetään joko kokonaisina tai dissekoituina mahdollista histopatologista arviointia varten (22).

TESTIN HYVÄKSYTTÄVYYSKRITEERIT

13. Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

— kuolleisuus vesi- (tai liuotin)kontrolleissa on enintään 10 prosenttia altistusjakson lopussa,

— liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan,

— veden lämpötila testiastioiden välillä vaihtelee enintään ± 1,5 °C milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2 °C siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2),

— saatavilla on oltava näyttöä, joka osoittaa, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista,

— on näyttöä siitä, että kalat kutevat aktiivisesti kaikissa rinnakkaisnäytteissä ennen kemiallisen altistuksen aloittamista ja rinnakkaiskontrolleissa koko testin ajan.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

14. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a. happi- ja pH-mittarit

b. laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen

c. asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan

d. kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettuja tankkeja, jotka ovat riittävän suuria suhteessa suositeltuun kalamäärään ja kalatiheyteen (ks. lisäys 2)

e. rasvapäämudun ja seeprakalan kutualusta; tarkemmat tiedot ovat lisäyksessä 4

f. riittävän tarkka vaaka (ts. tarkkuus ± 0,5 mg).

Vesi

15. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa vettä, jossa testilaji selviytyy ja kasvaa riittävän pitkän ajan. Veden laadun on oltava vakio koko testin ajan. Veden pH:n on oltava 6,5–8,5, mutta se saa kunkin testin aikana vaihdella enintään ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin analyyseja varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, and SO_4^{2-}), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esimerkiksi kuuden kuukauden välein). Lisäyksessä 3 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiliuokset

16. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista tai ultraääntä). Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimen käyttöä kantoaineena ei suositella. Jos liuotin on kuitenkin tarpeen, rinnalla on käytettävä liuotinkontrollia, ja liuotinpitoisuuden on oltava sama kuin kemikaalilla käsittelyissä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotin voi olla teknisesti paras ratkaisu. Tätä koskevat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta OECD:n ohjeasiakirjasta (23). Liuotin valitaan aineen tai seoksen kemiallisten ominaisuuksien perusteella. OECD:n ohjeasiakirjassa enimmäismääräksi suositellaan 100 µl/l, mitä on noudatettava. Hiljattain julkaistussa katsauksessa (24) kuitenkin korostetaan, että ylimääräisiä ongelmia on odotettavissa, jos hormonijärjestelmään kohdistuvia vaikutuksia testattaessa käytetään liuottimia. Sen vuoksi on suositeltavaa, että jos liuotinta tarvitaan, sen pitoisuus on pidettävä mahdollisimman pienenä aina, kun se on teknisesti toteutettavissa (testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan).

17. Testissä käytetään läpivirtaustestijärjestelmää. Tällainen järjestelmä annostelee ja laimentaa testiaineen varastoliuosta jatkuvasti (esimerkiksi annostelupumpulla, laimentimella, kyllästävällä järjestelmällä) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Heikkolaatuisia muoviletkuja tai muita sellaisia materiaaleja, jotka saattavat sisältää biologisesti aktiivisia kemikaaleja, ei pidä käyttää. Kun valitaan materiaalia läpivirtausjärjestelmään, testikemikaalin mahdollinen adsorptio tähän materiaaliin on otettava huomioon.

Kalojen hoito

18. Testikalat on valittava yhdestä laboratoriopopulaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. On tärkeää, että kalamäärä ja kalatiheys (ks. määritelmät lisäyksestä 1) ovat asianmukaiset käytettyjen testilajien kannalta (ks. lisäys 2).

19. Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, ja sitten noudatetaan seuraavia periaatteita:

— jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: koko erä hylätään

— jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta: kaloja totutetaan vielä seitsemän vuorokautta; jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia toisen seitsemän vuorokauden ajanjakson aikana, koko erä hylätään

— jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: erä hyväksytään.

20. Kalat eivät saa saada hoitoa sairauteen totutusjakson, esialtistusjakson tai altistusjakson aikana.

Esialtistus ja kalojen valinta

21. Yhdestä kahteen viikkoa kestävä esialtistusjakso on suositeltava, ja siinä eläimet sijoitetaan samanlaisiin astioihin kuin varsinaisessa testissä. Kaloja on ruokittava *ad libitum* koko hoito- ja altistusjakson ajan. Altistusjakso aloitetaan lisääntymiskypsiin koe-eläimiin kuuluvalla dimorfisella aikuisella kalalla (ts. jonka sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat rasvapäämudulla ja medakalla selvästi näkyvillä), joka kutee aktiivisesti. Rasvapäämutuja koskeva yleinen ohje on, että niiden iän on oltava 20 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Lisäksi on tarkkailtava kulloisenkin kalaerän varsinaista lisääntymistilaa. Medakojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Seeprakalojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 26 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Mätimunatuotantoa on arvioitava päivittäin esialtistusvaiheen aikana. On suositeltavaa, että kutua havainnoidaan kaikissa rinnakkaistankeissa ennen niiden sisällyttämistä tutkimuksen altistusvaiheeseen. Määrällistä suositusta toivottavasta mätimunatuotannosta ei voida tässä vaiheessa antaa, mutta on suhteellisen yleistä havaita kullakin lajilla keskimääräiseksi kuduksi > 10 mätimunaa/naaras/päivä. On käytettävä mätimunatuotannon tuloksen mukaan satunnaistettua lohkoasetelmaa, jotta rinnakkaisnäytteet voidaan jakaa eri testitasoille ja sitä kautta varmistaa rinnakkaisnäytteiden tasapainoinen jakauma

TESTISUUNNITELMA

22. Testissä käytetään kolmea pitoisuutta testikemikaalista, yhtä (vesi)kontrollia ja tarvittaessa yhtä liuotinkontrollia. Tiedot voidaan analysoida käsittely- ja kontrollivasteiden välisten, tilastollisesti merkitsevien erojen määrittämiseksi. Näistä analyyseista saadaan tietoa siitä, onko kemikaalin pidempiaikainen lisätestaus haittavaikutusten osalta (eloonjäämiseen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiseen) tarpeen sen sijaan, että näitä tietoja käytetään riskinarvioinnissa (25).

23. Kunkin käsittelytason seeprakalakoirailta ja -naarailta (viisi koirasta ja viisi naarasta kummassakin rinnakkaisnäytteessä) sekä kontrollikaloilta otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin mittaamista varten. Kunkin käsittelytason medakakoirailta ja -naarailta ja kontrollikaloilta (kolme koirasta ja kolme naarasta kussakin neljässä rinnakkaisnäytteessä) otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten. Rasvapäämutukoirailta ja -naarailta (kaksi koirasta ja neljä naarasta kaikissa neljässä rinnakkaisnäytteessä) ja kontrollikaloilta otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten. Hedelmällisyys on arvioitava määrällisesti, ja sukurauhaskudokset on kiinnitettävä joko kokonaisina tai leikeltynä mahdollista histopatologista arviointia varten, mikäli tarpeen.

Testipitoisuuksien valinta

24. Tässä testissä suurimmaksi testipitoisuudeksi on valittava annostason määrittämistutkimuksista tai muista toksisuustiedoista saatu suurin siedetty pitoisuus (MTC-arvo), tai 10 mg/l tai enimmäisliukoisuus vedessä sen mukaan, mikä arvo on pienin. MTC-arvo on kemikaalin suurin testauspitoisuus, jonka aiheuttama kuolleisuus on alle 10 prosenttia. Tässä menetelmässä edellytetään, että käytettävissä on empiiristä tietoa välittömästä toksisuudesta tai muita toksisuustietoja, joiden perusteella MTC-arvo voidaan estimoida. MTC-arvon estimointi voi olla epätarkkaa, ja siinä tarvitaan yleensä asiantuntijan näkemystä.

25. Testissä tarvitaan siis kolme testipitoisuutta, siten että pitoisuusvälin vakiokerroin saa olla enintään 10, ja laimennusvesikontrolli (sekä tarvittaessa liuotinkontrolli). Pitoisuusvälin kertoimen vaihteluvälin suositellaan olevan 3,2–10.

MENETTELY

Kalojen valinta ja punnitus

26. On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Lisäyksessä 2 esitetään suositeltava kokovaihtelu tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytetyssä koko kalaerässä koiras- ja naaraskalojen yksilöllisten painojen vaihteluväli testin alussa on mahdollisuuksien mukaan pidettävä ± 20 prosentissa saman sukupuolen painon aritmeettisesta keskiarvosta. Suositellaan, että osa erän kaloista punnitaan ennen testiä keskimääräisen painon estimoimiseksi.

Altistumisolosuhteet

Kesto

27. Testi kestää esialtistusjakson jälkeen 21 päivää. Suositeltu esialtistusjakso on yhdestä kahteen viikkoa.

Ruokinta

28. Kaloja on ruokittava *ad libitum* sopivalla ravinnolla (lisäys 2) riittävän usein, jotta ne pysyvät hyvässä kunnossa. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Yleisohje on, että päivittäinen annos voidaan jakaa kahteen tai kolmeen yhtä suureen annokseen, kun ruokintakertoja on useampia päivässä, ja ruokintakertojen välillä on oltava vähintään kolme tuntia aikaa. Suurempi kerta-annos on hyväksyttävää antaa etenkin viikonloppuisin. Kalat on pidettävä ravinnotta 12 tuntia ennen näytteenottoa/ruumiinavausta.

29. Kalojen rehu on tarkastettava mahdollisten kontaminanttien, kuten orgaanista klooria sisältävien torjuntaaineiden, polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen (PAH-yhdisteiden) ja polykloorattujen bifenyylien (PCB-yhdisteiden) varalta. Runsaasti fytoestrogeeneja sisältävää rehua on vältettävä, koska se heikentää testivastetta tunnetulle estrogeeniagonistille (esim. 17-b-estradiolille).

30. Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet on poistettava testiastioista vähintään kaksi kertaa viikossa; kunkin säiliön pohja on puhdistettava huolellisesti esimerkiksi käyttämällä lappoa.

Valo ja lämpötila

31. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan on oltava sopivia käytetylle testilajille (ks. lisäys 2).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

32. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemiallisesta stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet on määritettävä säännöllisesti seuraavasti: laimentimen ja myrkyllisen varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava mieluiten päivittäin mutta vähintään kahdesti viikossa, ja ne saavat vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Varsinaiset testikemikaalin pitoisuudet suositellaan mitattavan kaikista astioista testin alussa ja sen jälkeen viikon välein.

33. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testiaineen pitoisuus pysyy kuitenkin tyydyttävästi ± 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

34. Näytteet on mahdollisesti suodatettava (esim. 0,45 µm:n huokoskoon suotimella) tai sentrifugoitava. Mikäli se on tarpeen, sentrifugointi on suositeltava menetelmä. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

35. Testin aikana kaikista testiastioista on mitattava liuennut happi, lämpötila ja pH vähintään kerran viikossa. Kokonaiskovuus ja alkalisuus on mitattava kontrolleista ja suurimman pitoisuuden astiasta vähintään kerran viikossa. Lämpötilaa on mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

Havainnot

36. Monia yleisiä (esimerkiksi eloonjääneisyyttä) ja biologisia vasteita (kuten vitellogeniiniarvot) arvioidaan testin kuluessa tai sen päättyessä. Hedelmällisyyden päivittäinen määrällinen seuranta on tarpeen. Näiden ominaisuuksien mittaamista ja arviointia sekä tulosten käyttökelpoisuutta kuvataan jäljempänä.

Eloonjääneisyys

37. Kalat on tutkittava päivittäin testijakson aikana. Kuolleisuus on kirjattava, ja kuolleet kalat on poistettava testiastiasta mahdollisimman pian. Kuolleiden kalojen tilalle ei tule vaihtaa eläviä sen paremmin kontrolli- kuin käsittelyastioihinkaan. Testin aikana kuolleiden kalojen sukupuoli on määritettävä sukurauhasten makroskooppisella tutkimuksella.

Käyttäytyminen ja ulkonäkö

38. Kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen (kontrolleihin nähden) on kirjattava muistiin. Siitä osoituksena voivat olla yleisen toksisuuden merkit, kuten hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, tasapainon menetys sekä epätyypillinen liikkumattomuus tai syöminen. Myös muut ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto tai värimuutokset) on merkittävä muistiin. Tällaisia toksisuuden merkkejä on tulkittava varovasti tietoja analysoitaessa, koska ne voivat viitata pitoisuuksiin, joiden yhteydessä hormonijärjestelmään kohdistuviin vaikutuksiin liittyvät biomarkkerit eivät ole luotettavia. Näistä käyttäytymiseen liittyvistä havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista tietoa kaloilla testausta koskevia mahdollisia tulevia vaatimuksia varten. Esimerkiksi rasvapäämuduilla on havaittu androgeenialtistuksen yhteydessä reviiriin liittyvää aggressiivisuutta normaaleilla koirailla tai maskulinisoituneilla naarailla, kun taas seeprakaloilla estrogeeni- tai antiandrogeenialtistuksen on havaittu vähentävän lajityypillistä parittelu- ja kutemiskäyttäytymistä tai estävän sen keinovalon syttyessä.

39. Koska jotkin ulkonäköön liittyvät seikat (pääasiassa väri) voivat muuttua nopeasti käsittelyn yhteydessä, on tärkeää, että laadulliset havainnot tehdään ennen kuin eläimet poistetaan testijärjestelmästä. Rasvapäämuduista tähän saakka karttunut kokemus viittaa siihen, että jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aluksi aiheuttaa muutoksia seuraavissa ulkoisissa ominaisuuksissa: kalan väri (vaalea tai tumma), värityksen kuviot (pystysuorien raitojen ilmaantuminen) ja kalan muoto (pään ja rinnan alue). Sen vuoksi kalan fyysisestä ulkonäöstä on tehtävä havaintoja testin kuluessa ja tutkimuksen päättyessä.

Hedelmällisyys

40. Kutua koskevat määrälliset päivittäiset havainnot on kirjattava rinnakkaisnäytekohtaisesti. Mätimunatuotanto on kirjattava munien määränä eloonjäänyttä naarasta kohden päivässä rinnakkaisnäytekohtaisesti. Munat poistetaan testiastioista päivittäin. Rasvapäämudulle ja seeprakalalle on asetettava testiastiaan kutualusta, jotta kalat voivat kutea tavanomaisissa olosuhteissa. Lisäyksessä 4 on seeprakalalle (lisäys 4A) ja rasvapäämudulle (lisäys 4B) suositeltavia kutualustoja koskevia lisätietoja. Medaka ei tarvitse kutualustaa.

Kalojen humaani lopettaminen

41. Testipäivänä 21 eli altistuksen päättyessä kalat on lopetettava tarkoituksenmukaisella määrällä trikaiinia (trikaiinimetaanisulfonaatti, Metacain MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, puskuroitu 300 mg/l:n vahvuisella $NaHCO_3$:lla (natriumbikarbonaatti, CAS 144-55-8), limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Sen jälkeen kaloilta otetaan veri- tai kudosnäytteet vitellogeniinimääritystä varten, kuten vitellogeniinia koskevassa osiossa on selitetty.

Sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien havainnointi

42. Jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aiheuttaa muutoksia tietyissä erikoistuneissa sekundaarisissa sukupuoliominaisuuksissa (kutukyhmyjen lukumäärä rasvapäämutukoirailla ja sukuelinpapillien lukumäärä medakakoirailla). Kemikaalit, joilla on tiettyjä vaikutustapoja, voivat erityisesti aiheuttaa sen, että vastakkaisen sukupuolen eläimillä esiintyy sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten trenboloni, metyylitestosteroni ja dihydrotestosteroni, voivat aiheuttaa korostuneiden kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille tai sukuelinpapillien kehittymisen medakanaaraille (11, 20, 21). On myös raportoitu, että estrogeenireseptorin antagonistit saattavat vähentää kutukyhmyjen määrää ja pienentää selänpuoleista niskakyhmyä aikuisilla rasvapäämutukoirailla (26, 27). Näistä morfologisista havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista ja määrällistä tietoa kaloilla testausta koskevia mahdollisia tulevia vaatimuksia varten. Rasvapäämudun kutukyhmyjen ja medakan sukuelinpapillien lukumäärä ja koko voidaan määrittää suoraan tai käytännöllisemmin preparoiduilta yksilöiltä. Suositellut menetelmät rasvapäämudun ja medakan sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arvioimiseen on esitetty lisäyksessä 5A ja lisäyksessä 5B.

Vitellogeniini (VTG)

43. Verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriitti-kapillaariputkeen tai vaihtoehtoisesti sydänpunktiolla, joka tehdään ruiskulla. Kerättävän veren määrä vaihtelee kalan koon mukaan yleensä välillä 5–60 µl rasvapäämutuyksilöä kohti ja välillä 5–15 µl seeprakalayksilöä kohti. Plasma erotetaan verestä sentrifugoimalla, ja sitä säilytetään proteaasin estäjien kanssa – 80 °C:ssa vitellogeniinin analysointiin saakka. Toinen vaihtoehto on se, että vitellogeniinin määrityksen kudoslähteenä käytetään medakan maksaa ja seeprakalan pää-/pyrstöhomogenaattia (lisäys 6). Vitellogeniinin mittauksen on perustuttava validoituun homologiseen ELISA-menetelmään, jossa käytetään homologista vitellogeniinistandardia ja homologisia vasta-aineita. On suositeltavaa käyttää sellaista menetelmää, jolla pystytään havaitsemaan jopa niin alhaisia vitellogeniinitasoja kuin vain muutama ng/ml plasmassa (tai ng/mg kudoksessa), mitä pidetään altistumattomien koiraskalojen taustapitoisuutena.

44. Vitellogeniinianalyysin laatu varmistetaan käyttämällä standardeja, nollakokeita ja vähintään kaksinkertaista analyysia. Jokaisen ELISA-menetelmän yhteydessä on tehtävä matriisivaikutustesti (vaikutus näytteen laimentumiseen), jotta voidaan määrittää näytteen vähimmäislaimennuskerroin. Kuhunkin vitellogeniinianalyysissa käytettävään ELISA-levyyn on sisällytettävä seuraavat laadunvalvontanäytteet: vähintään kuusi kalibrointistandardia, jotka kattavat odotettujen vitellogeniinipitoisuuksien vaihteluvälin, ja vähintään yksi ei-spesifinen sitoutumismääritys -nollakoe (kaksinkertainen analyysi). Näissä nollakokeissa absorbanssin on oltava alle viisi prosenttia kalibrointistandardin enimmäisabsorbanssista. Jokaisesta näytelaimennoksesta analysoidaan vähintään kaksi alikvoottia (kaksi rinnakkaiskuoppaa). Rinnakkaiskuopat, joiden arvot eroavat toisistaan yli 20 prosenttia, on analysoitava uudelleen.

45. Kalibrointikäyrien korrelaatiokertoimen (R^2) on oltava yli 0,99. Suuri korrelaatio ei kuitenkaan yksinään riitä takaamaan pitoisuuden asianmukaista ennustamista kaikissa vaihteluväleissä. Sen lisäksi, että korrelaatio kalibrointikäyrään on riittävän suuri, kunkin standardin pitoisuuden on – kalibrointikäyrästä laskettuna oltava 70–120 prosenttia sen nimellispitoisuudesta. Jos nimellispitoisuuksissa on havaittavissa kalibroinnin regressiolinjasta poispäin suuntautuva trendi (esimerkiksi pienemmillä pitoisuuksilla), voi olla tarpeen jakaa kalibrointikäyrä alempaan ja ylempään vaihteluväliin tai käyttää epälineaarista mallia, jotta absorbanssitiedot saadaan sovitettua asianmukaisesti. Jos käyrä jaetaan, kummankin linjan segmentin R^2 on oltava > 0,99.

46. Havaitsemisrajaksi (LOD) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus, ja määritysrajaksi (LOQ) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus kerrottuna pienimmällä laimennuskertoimella.

47. Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta (lisäys 7). Odotuksenmukaisen pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

Sukurauhasten histopatologinen arviointi

48. Sääntelyviranomaiset saattavat vaatia sukurauhasten histopatologista tutkimusta kohde-elimen tutkimiseksi HPG-akselilla kemiallisen altistuksen jälkeen. Tätä varten sukurauhaset kiinnitetään joko kokonaisina tai dissekoituina. Jos histopatologiaa vaaditaan, sukurauhasista etsitään erityisesti hormonijärjestelmään liittyviä vasteita, kun testikemikaalin vaikutusta hormonijärjestelmään arvioidaan. Tällaisia diagnostisia vasteita ovat ennen kaikkea testikulaariset munasolut, Lydiginsolun hyperplasia, alentunut ruskuaisen muodostus, lisääntynyt alkusiemensolujen määrä ja perifollikulaarinen hyperplasia. Muilla sukurauhasvaurioilla, kuten munasolujen atresialla, testikulaarisella degeneraatiolla ja kehitysvaihemuutoksilla, voi olla erilaisia syitä. Kalojen sukurauhasten histopatologiaa koskevassa ohjeasiakirjassa ilmoitetaan menettelyt, joita käytetään sukurauhasten dissekointiin, kiinnittämiseen, lohkomiseen ja histopatologiseen arviointiin (22).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Biomarkkerivasteiden arviointi varianssianalyysilla (ANOVA)

49. Jotta voidaan tunnistaa kemikaalin mahdollinen vaikutus, käsittely- ja kontrolliryhmien vasteita verrataan käyttämällä varianssianalyysia (ANOVA). Jos käytetään liuotinkontrollia, on tehtävä asianmukainen tilastollinen testi laimennusvesi- ja liuotinkontrollien välillä kunkin tutkittavan ominaisuuden osalta. Ohjeita siitä, miten laimennusvesi- ja liuotinkontrolleja koskevia tietoja käsitellään tilastollisessa analyysissa, on OECD:n asiakirjassa 2006c (28). Kaikki tiedot biologisesta vasteesta on analysoitava ja raportoitava kummastakin sukupuolesta erikseen. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty – epänormaali jakauma (esimerkiksi Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi tai Levenen testi) – on harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysia tai painotetun ANOVAn tekemistä. Monivertailuihin liittyvää Dunnettin testiä (parametrinen) tai Mann-Whitneyn testiä ja Bonferronin korjausta (ei-parametrinen) voidaan käyttää ei-monotonisten annosvasteiden yhteydessä. Muita tilastollisia testejä voidaan käyttää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testi tai Williamsin testi), jos annosvaste on jotakuinkin monotoninen. Lisäyksessä 8 on tilastollinen vuokaavio, joka on tarkoitettu avuksi, kun päätetään, mikä on tarkoituksenmukaisin tilastollinen testi käytettäväksi. Lisätietoja on myös ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevassa OECD:n asiakirjassa ”Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (28).

Testitulosten raportointi

50. Tutkimustietoihin on sisällytettävä seuraavat seikat:

Testauslaitos:

— vastuuhenkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— jokaisen laboratorion pätevyys on osoitettava käyttämällä monenlaisia edustavia kemikaaleja

Testikemikaali:

— testikemikaalin luonnehdinta

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— testipitoisuuksien valmistusmenetelmä ja valmistustiheys

— tiedot stabiiliudesta ja biohajoavuudesta

Liuotin:

— liuottimen luonnehdinta (tyyppi, käytetty pitoisuus)

— liuottimen valinnan perustelut (jos muu kuin vesi)

Koe-eläimet:

— laji ja kanta

— toimittaja ja toimittajan tilat

— kalan ikä testin alussa ja sen lisääntymis-/kututila

— tarkat tiedot eläinten totutusmenetelmästä

— kalan paino altistuksen alussa (kalaerän osan punnituksen perusteella)

Testiolosuhteet:

— käytettävä testimenetelmä (testin tyyppi, kalamäärä, kalatiheys jne.)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja virtausnopeus

— nimellistestipitoisuudet, testiliuosten viikoittain mitatut pitoisuudet ja käytetyt analyysimenetelmät, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa ja todisteet siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia todellisessa liuoksessa

— laimennusveden ominaisuudet (mukaan luettuina pH, kovuus, alkalisuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet, orgaanisen hiilen kokonaismäärä, suspendoituneet kiinteät aineet ja muut tehdyt mittaukset)

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus

— tarkat tiedot ruokinnasta (esimerkiksi rehu(je)n tyyppi, lähde, annettu määrä ja antotiheys) sekä analyysit merkittävistä kontaminanteista, mikäli saatavilla (esimerkiksi PCB-yhdisteet, PAH-yhdisteet ja orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet)

Tulokset

— näyttö siitä, että kontrollit täyttävät testin hyväksyttävyyskriteerit

— kuolleisuutta koskevat tiedot testipitoisuuksissa ja kontrolleissa

— käytetyt tilastolliset analyysitekniikat, aineiston käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut

— paljain silmin näkyviä morfo-biologisia havaintoja, mukaan luettuina sekundaariset sukupuoliominaisuudet, mätimunatuotantoa ja vitellogeniinia koskevat tiedot

— tulokset aineiston analyyseista mieluiten taulukkoina ja graafisessa muodossa

— tiedot kalojen mahdollisista epätavallisista reaktioista ja testikemikaalin aiheuttamista mahdollisista näkyvistä vaikutuksista

TESTITULOSTEN TULKINTAA JA HYVÄKSYMISTÄ KOSKEVAT OHJEET

51. Tämä kohta sisältää joitakin seikkoja, jotka on otettava huomioon, kun eri tutkittavia ominaisuuksia koskevia testituloksia tulkitaan. Tuloksia on tulkittava varoen, jos testikemikaali vaikuttaa aiheuttavan ilmeistä toksisuutta tai vaikuttavan koe-eläimen yleiskuntoon.

52. Testipitoisuuksien vaihteluvälin asettamisessa on varottava ylittämästä suurinta siedettyä pitoisuutta, jotta aineiston järkevä tulkinta on mahdollista. On tärkeää, että testissä on vähintään yksi käsittely, jossa ei ilmene merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista. Sairauden ja myrkyllisten vaikutusten merkit on arvioitava ja raportoitava perinpohjaisesti. On esimerkiksi mahdollista, että naarailla vitellogeniinin tuotantoon voivat vaikuttaa myös yleinen toksisuus ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus). Vaikutusten tulkintaa voidaan kuitenkin vahvistaa muilta käsittelytasoilta saaduilla tuloksilla, joita ei voida perustella systeemisellä toksisuudella.

53. Testituloksen hyväksyttävyyden kannalta on otettava huomioon muutamia seikkoja. Perusohje on, että kontrolliryhmien koiraiden ja naaraiden vitellogeniinitasot on eriytettävä ja eroteltava rasvapäämudulla ja seeprakalalla noin kolmeen suuruusluokkaan ja medakalla noin yhteen suuruusluokkaan. Validointiraporteissa (1, 2, 3, 4) on esimerkkejä kontrolli- ja käsittelyryhmistä saatujen arvojen vaihteluvälistä. Kontrolliryhmän koirailla tavatut suuret vitellogeniiniarvot voivat heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita heikkoja estrogeeniagonisteja. Kontrolliryhmän naarailla tavatut pienet vitellogeniiniarvot voivat niin ikään heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita aromataasin estäjiä ja estrogeeniantagonisteja. Nämä ohjeet on laadittu validointitutkimusten perusteella.

54. Mätimunatuotannon määrälliseen määrittämiseen liittyy merkittävää vaihtelua [variaatiokerroin voi vaihdella 20–60 prosenttia], mikä vaikuttaa kykyyn havaita tutkimuksessa alle 70 prosentin merkitsevä vähennys munatuotannossa, kun variaatiokerroin lähenee 50:tä prosenttia tai ylittää sen. Jos variaatiokerroin rajoitetaan tätä alempiin arvoihin (noin 20–30 prosenttiin), tutkimuksessa saavutetaan hyväksyttävä voima (80 prosenttia) havaita 40–50 prosentin vähennys mätimunatuotannossa. Rasvapäämudulla käytetty testisuunnitelma, johon sisällytetään neljä rinnakkaisnäytettä käsittelytasoa kohden, antaa lisää voimaa hedelmällisyysominaisuuden tutkimiseen verrattuna testisuunnitelmaan, jossa on vain kaksi rinnakkaisnäytettä.

55. Jos laboratorio ei ole tehnyt määritystä aikaisemmin tai jos on tehty huomattavia muutoksia (esimerkiksi kalakannan tai toimittajan vaihto), on syytä tehdä tekninen pätevyystutkimus. On suositeltavaa, että siinä käytetään kemikaaleja, joilla on monenlaisia vaikutustapoja tai jotka vaikuttavat lukuisiin testissä tutkittaviin ominaisuuksiin. Käytännössä jokaista laboratoriota kehotetaan keräämään oma kontrollitietokanta koiraita ja naaraita varten sekä käyttämään positiivista kemikaalikontrollia estrogeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-estradioli pitoisuudella 100 ng/l tai tunnettu heikko agonisti), jolloin koiraskalojen vitellogeniini lisääntyy, positiivista kemikaalikontrollia aromataasin eston osalta (esimerkiksi fadrotsoli tai prokloratsi pitoisuudella 300 µg/l), jolloin naaraskalojen vitellogeniini vähenee, ja positiivista kemikaalikontrollia androgeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-trenboloni pitoisuudella 5 µg/l), jolloin rasvapäämutu- ja medakanaaraille alkaa kehittyä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Kaikkia näitä tietoja voidaan verrata validointitutkimuksista (1, 2, 3) saatuihin tietoihin, jotta laboratorion pätevyys saadaan varmistettua.

56. Yleensä vitellogeniinimittauksia pidetään positiivisina, jos koiraiden vitellogeniini lisääntyy tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$), tai jos naaraiden vitellogeniini vähenee tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$) ainakin suurimman testatun annoksen yhteydessä kontrolliryhmään verrattuna ja jos merkkejä yleisestä toksisuudesta ei ole. Positiivista tulosta tukee myös se, että annoksen ja vastekäyrän välillä voidaan osoittaa olevan biologisesti todennäköinen suhde. Kuten aiemmin on mainittu, vitellogeniinin vähentyminen ei välttämättä johdu pelkästään hormonijärjestelmästä, mutta positiivinen tulos on yleensä kuitenkin tulkittava todisteeksi hormonijärjestelmään kohdistuvasta vaikutuksesta *in vivo*, minkä perusteella asiaa on tutkittava tarkemmin.

57. Sääntelyviranomaiset saattavat vaatia sukurauhasten histopatologista arviointia, jonka avulla määritetään testieläinten lisääntymiskunto ja testituloksia voidaan arvioida näytön perusteella. Sukurauhasten histopatologinen tutkimus ei ehkä ole tarpeen tapauksissa, joissa joko vitellogeniini tai sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat positiivisia (eli vitellogeniini on lisääntynyt tai vähentynyt tai sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia on kehittynyt).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2006a), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60, Pariisi.

(1) OECD (2006b), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61, Pariisi.

(2) OECD (2007), Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 78, Pariisi.

(3) Owens, J. W. (2007), Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine, http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (viittauspäivä 18.9.2008).

(4) US EPA (2007), Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report, 15.12.2007, Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto, Washington, DC, 104 s.

(5) OECD (2008), Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, Pariisi.

(6) Sumpter, J. P. ja Jobling, S. (1995), Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173–8 Review.

(7) Pawlowski S. ja muut (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277–91.

(8) Andersen L. ja muut (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343–52.

(9) Ankley G. T. ja muut (2002), Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121–30.

(10) Panter G. H. ja muut (2004), Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11–21.

(11) Parks L. G. ja muut (1999), Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113–25.

(12) Panter G. H. ja muut (1999), Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bryssel, Belgia.

(13) Fenske M. ja muut (2001), Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217–232.

(14) Holbech H. ja muut (2001), Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119–131.

(15) Rose J. ja muut (2002), Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531–539.

(16) Brion F. ja muut (2002), Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; nide 21: 1699–1708.

(17) Yokota H. ja muut (2001), Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(18) Tatarazako N. ja muut (2004), Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301–308.

(19) Ankley G. T. ja muut (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350–60.

(20) Seki M. ja muut (2004), Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774–81.

(21) OECD (2010), Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Pariisi.

(22) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 23, Pariisi.

(23) Hutchinson T. H. ja muut (2006a), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, s.69–92.

(24) Hutchinson T. H. ja muut (2006b), Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts," not "traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106–14.

(25) Miles-Richardson S. R. ja muut (1999), Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129–145.

(26) Martinovic D. ja muut (2008), Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478–488.

(27) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariisi.

(28) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, 30.1.2008, Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto, Washington DC, 110 s.

(29) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Pariisi.

Lisäys 1

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

CV (*coefficient of variation*): Variaatiokerroin.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

Kalamäärä: Kalojen tuorepaino suhteessa vesimäärään.

Kalatiheys: Kalojen lukumäärä suhteessa vesimäärään.

Kemikaali: Aine tai seos.

MTC (*Maximum Tolerated Concentration*): Suurin siedetty pitoisuus, noin 10 prosenttia LC_{50}-arvosta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

VTG: Vitellogeniini – fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisen esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

Lisäys 2

KALOJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN KOHDISTUVAN SEULONTATUTKIMUKSEN KOEOLOSUHTEET

1. Suositeltu laji	Rasvapäämutu (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Seeprakala (*Danio rerio*)
2. Testityyppi	Läpivirtaus	Läpivirtaus	Läpivirtaus
3. Veden lämpötila	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)
5. Valovoimat	10–20 μE/m²/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 μE/m²/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 μE/m²/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)
6. Valoisa aika (valoisan ja pimeän väliset siirtymät valinnaisia, niitä ei kuitenkaan pidetä välttämättöminä)	16 t valoisaa, 8 t pimeää	12–16 t valoisaa, 12–8 t pimeää	12–16 t valoisaa, 12–8 t pimeää
7. Kalamäärä	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti
8. Testiastian koko	10 l (vähintään)	2 l (vähintään)	5 l (vähintään)
9. Testiliuoksen tilavuus	8 l (vähintään)	1,5 l (vähintään)	4 l (vähintään)
10. Testiliuosten vaihto	Vähintään 6 kertaa päivässä	Vähintään 5 kertaa päivässä	Vähintään 5 kertaa päivässä
11. Testiorganismien ikä	Ks. 21 kohta.	Ks. 21 kohta.	Ks. 21 kohta.
12. Täysikasvuisen kalan arvioitu tuorepaino (g)	Naaraat: 1,5 ± 20 % Urokset: 2,5 ± 20 %	Naaraat: 0,35 ± 20 % Urokset: 0,35 ± 20 %	Naaraat: 0,65 ± 20 % Urokset: 0,4 ± 20 %
13. Kalojen lkm. testiastiaa kohti	6 (2 koirasta ja 4 naarasta)	6 (3 koirasta ja 3 naarasta)	10 (5 koirasta ja 5 naarasta)
14. Käsittelyjen lkm.	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)
15. Astioiden lkm. käsittelyä kohti	Vähintään 4	Vähintään 4	Vähintään 2
16. Kalojen lkm. testipitoisuutta kohti	16 täysikasvuista naarasta ja 8 koirasta (4 naarasta ja 2 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	12 täysikasvuista naarasta ja 12 koirasta (3 naarasta ja 3 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	10 täysikasvuista naarasta ja 10 koirasta (5 naarasta ja 5 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)

17. Ruokinta	Eläviä tai pakastettuja täysikasvuisia suolalehtijalkaisia tai niiden nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisten naupliustoukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisten naupliustoukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä
18. Ilmastus	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta
19. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi
20. Esialtistusjakso	Suositus 7–14 vrk	Suositus 7–14 vrk	Suositus 7–14 vrk
21. Kemikaalialtistuksen kesto	21 vrk	21 vrk	21 vrk
22. Tutkittavat biologiset ominaisuudet	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — sekundaariset sukupuolio-minaisuudet — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — sekundaariset sukupuolio-minaisuudet — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia
23. Testin hyväksyttävyys	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 25 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 25 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 26 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.

Lisäys 3

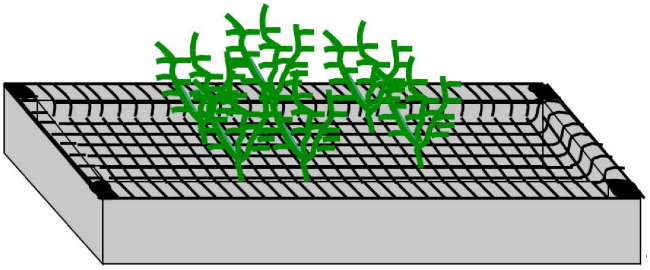
JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

AINESOSA	PITOISUUDET
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

Lisäys 4A

SEEPRAKALAN KUTUALUSTA

Kututarjotin: Lasinen instrumenttitarjotin (koko esimerkiksi 22 × 15 × 5,5 cm (p × l × s)), jonka päällä irrotettava ruostumaton teräsristikko (silmäkoko 2 mm). Ristikonon peitettävä instrumenttitarjotin hieman reunojen alapuolelta.



Kutualusta on kiinnitettävä ristikkoon. Kutualustaan on muodostettava rakenne, jolle kalat voivat siirtyä. Sopivia rakenteita ovat esimerkiksi vihreästä muovimateriaalista valmistetut keinotekoiset akvaariokasvit (huom. testikemikaalin adsorptio muovimateriaaliin on muistettava ottaa huomioon). Muovimateriaalia on huuhdeltava runsaassa lämpimässä vedessä riittävän kauan, jotta varmistetaan, ettei testiveteen joudu kemikaaleja. Lasimateriaaleja käytettäessä on varmistettava, etteivät kalat vahingoitu ja että niillä on riittävästi tilaa rajuihinkin liikkeisiin.

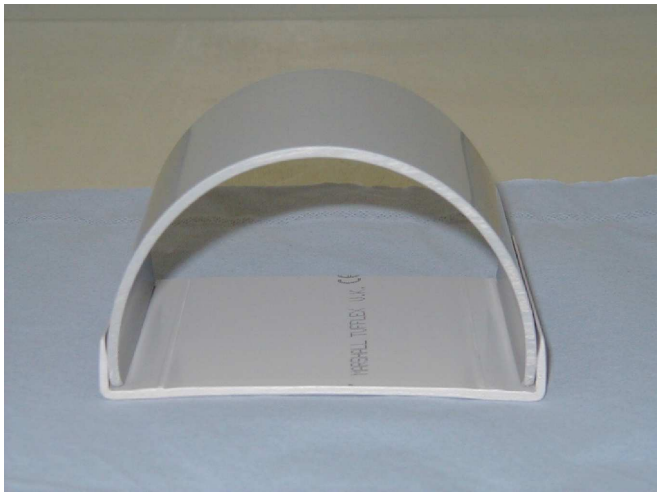
Tarjottimen ja lasilevyjen välisen etäisyyden on oltava vähintään kolme senttimetriä sen varmistamiseksi, ettei kuteminen tapahdu tarjottimen ulkopuolella. Tarjottimelle lasketut mätimunat putoavat ristikon läpi, ja ne voidaan kerätä näytteenottoa varten 45–60 minuutin kuluttua valojen sytyttämisestä. Läpinäkyvät mätimunat eivät ole tahmeita, ja ne on helppo laskea poikittaisvalossa. Kun astiassa on viisi naarasta, 20:tä mätimunaa päivässä voidaan pitää pienenä määränä, 100:aa mätimunaa kohtalaisena määränä ja yli 100:aa mätimunaa suurena määränä. Kutualusta on poistettava astiasta ja mätimunat on kerättävä joko mahdollisimman myöhään illalla tai erittäin varhain aamulla, ja alusta on laitettava sen jälkeen takaisin testiastiaan. Alusta on laitettava takaisin astiaan tunnin kuluessa sen poisottamisesta, sillä muutoin kutualusta saattaa houkutella kalat parittelemaan tai kutemaan yksilöllisesti epätavallisiin aikoihin. Jos tilanne vaatii kutualustan laittamista takaisin myöhemmin, se on tehtävä vähintään yhdeksän tunnin kuluttua valojen sytyttämisestä. Niin myöhäiseen vuorokaudenaikaan se ei aiheuta enää kutemista.

Lisäys 4B

RASVAPÄÄMUDUN KUTUALUSTA

Jokaiseen testiastiaan asetetaan kaksi tai kolme muovista/keramiikasta/lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettua kutulaattaa ja -levyä (esimerkiksi 80 mm pitkä harmaa puoliympyrän muotoinen katos 130 mm pitkän huulletun levyn päälle) (ks. kuva). Asianmukaisesti katetut PVC- tai keramiikkalaatat ovat osoittautuneet sopiviksi kutualustoiksi (Thorpe ja muut 2007).

Laattoja kannattaa karhentaa hieman, jotta mätimunat kiinnittyvät niihin paremmin. Tarjotin on suojattava siten, etteivät kalat pääse laskettujen mätimunien luokse, ellei ole osoitettu, että munat kiinnittyvät käytettyyn alustaan pitävästi.



Alusta on suunniteltava siten, että kaikki mätimunat, jotka eivät kiinnity laatan pintaan ja putoaisivat muutoin astian pohjalle, jäävät sille (samoin kuin munat, jotka lasketaan suoraan sileälle muovialustalle). Kaikkia kutualustoja on huuhdeltava vähintään 12 tuntia laimennusvedessä ennen käyttöä.

Thorpe K. L., Benstead R., Hutchinson T. H., Tyler C. R. (2007), An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

Lisäys 5A

RASVAPÄÄMUDUN SEKUNDAARISTEN SUKUPUOLIOMINAISUUKSIEN ARVIOINTI TIETTYJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN VAIKUTTAVIEN KEMIKAALIEN HAVAITSEMISEKSI

Yleiskatsaus

Hormonitoimintaa häiritsevien aineiden testauksessa mahdollisesti tärkeitä fyysiseen ulkonäköön liittyviä piirteitä täysikasvuisilla rasvapäämuduilla ovat väri (vaalea/tumma), värityskuviot (onko esimerkiksi pystysuoria raitoja vai ei), kalan muoto (pään ja rinnan alueen muoto, vatsan pullistuneisuus) sekä erikoistuneet sekundaariset sukupuoliominaisuudet (kutukyhmyjen lukumäärä ja koko, niskakyhmyn koko, munanasetin).

Kutukyhmyt sijaitsevat sukukypsien rasvapäämutukoiraiden päässä (niskakyhmyssä), ja ne ovat useimmiten järjestäytyneet molemmin puolin symmetriseksi kuvioksi (Jensen ja muut 2001). Kontrollinaarailla sekä nuorilla koirailla ja naarailla kyhmyt eivät ole kehittyneet (Jensen ja muut 2001). Koiraiden silmien ympärillä ja sierainten välissä voi olla jopa kahdeksan yksittäistä kyhmyä. Eniten kyhmyjä on kahdella samansuuntaisella viivalla heti sierainten alapuolella ja suun yläpuolella, ja ne ovat myös suurimpia kyhmyjä. Monilla kaloilla kyhmyryhmiä on alaleuan alapuolella. Suuta lähimpänä sijaitsee yleensä yksittäinen kyhmypari, kun taas lähempänä vatsapuolta voi olla jopa neljästä kyhmystä muodostuva sarja. Kyhmyjen todellinen määrä on harvoin yli 30 (vaihteluväli 18–28; Jensen ja muut, 2001). Useimmat kyhmyt (määrän kannalta) ovat yksittäisiä, pyöreähköjä rakenteita, joiden korkeus vastaa suurin piirtein niiden sädettä. Useimmilla sukukypsillä koirailla on ainakin joitakin kyhmyjä, jotka ovat siinä määrin laajentuneita ja korostuneita, ettei niistä voi erottaa yksittäisiä rakenteita.

Tietyntyyppiset hormonitoimintaa häiritsevät kemikaalit voivat aiheuttaa sen, että tiettyjä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia alkaa esiintyä vastakkaisella sukupuolella. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten 17α-metyylitestosteroni tai 17β-trenboloni, voivat aiheuttaa kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille (Smith 1974; Ankley ja muut 2001; 2003), kun taas estrogeenireseptorin agonistit saattavat vähentää koiraiden kutukyhmyjen määrää tai pienentää niiden kokoa (Miles-Richardson ja muut 1999; Harries ja muut 2000).

Jäljempänä on kuvaus rasvapäämutujen kutukyhmyjen luonnehdinnasta, joka perustuu Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston laboratoriossa (Duluth, MN) käytettyihin menettelyihin. Tietyt tuotteet ja/tai laitteet voidaan korvata saatavilla olevilla samantyyppisillä materiaaleilla.

Kalojen tutkimisessa on parhainta käyttää valollista suurennuslasia tai valollista dissektiomikroskooppia (3X). Tutki kalaa selkäpuolelta ja siten, että sen etupää on eteenpäin (pää tutkijaa kohti).

— Aseta kala pieneen petrimaljaan (halkaisija esimerkiksi 100 mm) etupää eteenpäin ja vatsapuoli alaspäin. Tarkenna etsintä, jotta pystyt tunnistamaan kyhmyt. Käännä kalaa varovasti ja hitaasti puolelta toiselle kyhmyalueiden tunnistamiseksi. Laske ja pisteytä kyhmyt.

— Tutki myös pään pinta vatsapuolelta asettamalla kala petrimaljaan selkäpuoli alaspäin etupää eteenpäin.

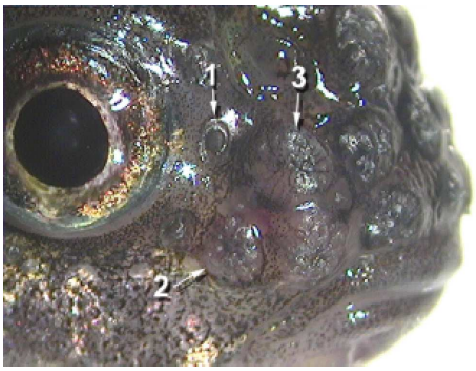
— Jokaisen kalan tutkimus on tehtävä kahdessa minuutissa.

Kyhmyjen laskeminen ja arviointi

Täysikasvuisilta rasvapäämuduilta on tunnistettu kuusi aluetta, joilla kyhmyjen esiintymistä ja kehittymistä voidaan arvioida. On laadittu myös malli, johon kyhmyjen sijainti ja lukumäärä voidaan merkitä (ks. tämän lisäyksen loppu). Kyhmyjen lukumäärä merkitään muistiin, ja niiden kokoa voidaan arvioida määrällisesti seuraavasti: 0 – ei kyhmyjä, 1 – kyhmyjä, 2 – laajentuneita kyhmyjä ja 3 – korostuneita kyhmyjä kunkin organismin osalta (kuva 1).

Luokka 0 – kyhmyjä ei ole. Luokka 1 – kyhmyjä: tähän luokkaan kuuluvat kaikki kyhmyt, joissa on yksi piste, jonka korkeus on miltei sama kuin sen säde. Luokka 2 – laajentuneita kyhmyjä: Tähän luokkaan kuuluu sellainen kudos, jonka ulkonäkö muistuttaa asteriskia. Tällaisessa kyhmyssä on yleensä laaja säteittäinen pohja, jossa on keskeltä reunoille päin suuntautuvia uria tai vakoja. Kyhmyn huippu on usein muita epätasaisempi, mutta joskus se voi olla myös hieman pyöristynyt. Luokka 3 – korostunut: Tähän luokkaan kuuluvat kyhmyt ovat tavallisesti varsin suuria ja pyöreitä, ja niiden rakenne on muita epäselvempi. Toisinaan tällaiset kyhmyt yhtyvät muodostaen yhtenäisen massan yhdelle alueelle tai useammalle alueelle (B, C ja D, kuvattu jäljempänä). Kyhmyjen väri ja muoto vastaavat luokkaa 2, mutta joskus ne ovat melko epämääräisiä. Tätä arviointimenetelmää käyttämällä kyhmyjen kokonaispistemäärä on yleensä < 50 normaalilla kontrollikoiraalla, jolla on 18–20 kutukyhmyä (Jensen ja muut 2001).

Kuva 1



Joidenkin kalojen kutukyhmyjen todellinen määrä voi olla suurempi kuin mallin ruuduissa tietyllä pisteytysalueella. Jos näin on, pisteytysnumeroita voi lisätä laatikon oikealle tai vasemmalle puolelle. Mallin ei siis tarvitse näyttää symmetriseltä. Toinen tapa merkitä muistiin parilliset kyhmyt tai sellaiset kyhmyt, jotka ovat yhtyneet pystysuunnassa yhteen suun vaakasuuntaista tasoa pitkin, on merkitä yhteen ruutuun kahdet arviointipisteet.

Merkitsemisalueet:

A – Silmän ympärillä sijaitsevat kyhmyt. Merkitään selkäpuolelta vatsan puolelle silmän etureunan ympäriltä. Sukukypsillä kontrollikoirailla näitä on tavallisesti useita; kontrollinaarailla näitä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla on yleensä yksi pari kyhmyjä (yksi kummankin silmän lähellä) tai yksittäinen kyhmy.

B-Sierainten (aistikanavahuokosten) välissä sijaitsevat kyhmyt. Kontrollikoirailla ne ovat yleensä parilliset, kehittyneet ylemmän luokituksen (2 – laajentuneet kyhmyt tai 3 – korostuneet kyhmyt) mukaan. Kontrollinaarailla näitä kyhmyjä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla niitä voi esiintyä ja kehittyä jonkin verran.

C – Sierainten edessä suun vieressä sijaitsevat kyhmyt. Sukukypsillä kontrollikoirailla ne ovat yleensä laajentuneet tai korostuneet. Nuoremmilla koirailla tai androgeenikäsitellyillä naarailla näitä esiintyy, voivat olla laajentuneita.

D – Suulinjan suuntaisesti sijaitsevat kyhmyt. Arvioidaan yleensä kehittyneiksi kontrollikoirailla. Näitä kyhmyjä ei ole kontrollinaarailla, kun taas androgeeneille altistuneilla naarailla niitä on.

E – Alaleuassa suun lähellä sijaitsevat kyhmyt, jotka ovat yleensä pieniä ja tavallisesti pareittain. Niitä esiintyy vaihtelevasti kontrollikoirailla tai käsitellyillä koirailla sekä käsitellyillä naarailla.

F – Alaleuassa E:stä vatsaan päin sijaitsevat kyhmyt, jotka ovat yleensä pieniä ja tavallisesti pareittain. Niitän esiintyy kontrollikoirailla ja androgeeneille altistuneilla naarailla.

VIITTEET

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001), Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J, Hornung, M. W., Henry, T. R, Denny, J. S., Leino, R. L, Wilson, V. S, Cardon, M. C, Hartig, P. C, Gray, E. L. (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow *Environ Toxicol Chem* 22:1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000), Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas), Environ Sci Technol* 34:3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. (2001), Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas), Comp Biochem Physiol C* 128:127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. (2001), Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow, *J Fish Biol* 59:515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999), Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas), Aquat Toxicol* 47:129–145.

(7) Smith R. J. F. (1974), Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031–1038.

Kyhmyjen kirjaamismalli:

Tunniste _____

Päiväys _____

Kokonaispistemäärä ____

Numeerinen pisteytys

1 – esiintyy

2 – laajentuneet

3 – korostuneet

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

Lisäys 5B

MEDAKAN SEKUNDAARISTEN SUKUPUOLIOMINAISUUKSIEN ARVIOINTI TIETTYJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN VAIKUTTAVIEN KEMIKAALIEN HAVAITSEMISEKSI

Jäljempänä on kuvaus sukuelinpapilleista (*), jotka ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia medakalla (*Oryzias latipes*).

(1) Maksan poistamisen (lisäys 6) jälkeen kalan ruumis asetetaan kartiomaiseen putkeen (pää ylöspäin, pyrstö alaspäin), joka sisältää noin 10 ml 10-prosenttista neutraalia puskuroitua formaliinia. Jos sukurauhanen on kiinnitetty muuhun kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroituun formaliiniin, leikkaa ruumis partaterällä poikittain peräevän etuosan ja peräaukon välistä varovasti, jotta gonopori ja sukurauhanen eivät vaurioidu (kuva 3). Laita kalan ruumiin kallonpuoleinen osa kiinnitysliuokseen sukurauhasen säilömiseksi ja pyrstönpuoleinen osa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin edellä kuvatun mukaisesti.

(2) Kun kalan ruumis on laitettu 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin, tartu peräevän etuosaan pinseteillä ja pidä sitä taitettuna noin 30 sekunnin ajan, jotta peräevä pysyy auki. Kun tartut peräevään pinseteillä, käsittele etuosan eväpoimuja varovasti, jotta sukuelinpapillit eivät vaurioidu.

(3) Kun peräevä on ollut auki noin 30 sekunnin ajan, laita kalan ruumis 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin ja säilytä sitä huoneenlämmössä sukuelinpapillien mittaukseen saakka (mittaus on tehdaan, kun kiinnityksestä on kulunut vähintään 24 tuntia).

Mittaus

(1) Kun kalan ruumis on ollut kiinnitettynä 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin vähintään 24 tuntia, ota se pois kartiomaisesta putkesta ja pyyhi formaliini suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

(2) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Irrota peräevä varovasti pienillä dissektiosaksilla (peräevä kannattaa leikata siten, että sen mukana tulee myös hieman rintaevän tukiluuta).

(3) Tartu irrotetun peräevän etuosaan pinseteillä ja aseta muutamin vesitipoin kostutetulle lasilevylle. Peitä peräevä peitinlasilla. Kun tartut peräevään pinseteillä, ole varovainen, etteivät sukuelinpapillit vaurioidu.

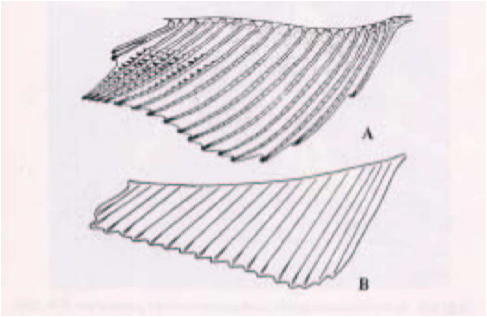
(4) Laske niiden liitoslevyjen määrä, joissa on sukuelinpapilleja, käyttämällä biomikroskoopin näytetasoa (pystymikroskooppi tai käänteismikroskooppi). Sukuelinpapillit ovat tunnistettavissa liitoslevyn takaosassa näkyvästä pienestä papillimuodostelmasta. Merkitse kunkin eväpoimun liitoslevyssä olevien sukuelinpapillien määrä lomakkeeseen (ts. ensimmäinen eväpoimu: 0, toinen eväpoimu: 10, kolmas eväpoimu: 12 jne.) ja kirjoita kokonaislukumäärä Excel-työkirjaan kunkin yksittäisen kalan osalta. Ota peräevästä tarvittaessa valokuva ja laske siitä niiden liitoslevyjen lukumäärä, joissa on sukuelinpapilleja.

(5) Laita peräevä mittauksen jälkeen 1 kohdassa kuvattuun kartioputkeen ja varastoi se.

(*) Sukuelinpapilleja on yleensä vain täysikasvuisilla koirailla, ja ne sijaitsevat toisen ja seitsemännen tai kahdeksannen eväpoimun välissä peräevän takapäästä laskettuna (kuvat 1 ja 2). Papilleja on kuitenkin harvoin peräevän takapäästä katsottuna ensimmäisessä eväpoimussa. Tämä menettelytapaohje kattaa ensimmäisessä eväpoimussa olevien papillien mittauksen (tässä ohjeessa eväpoimun numero tarkoittaa poimujen järjestystä peräevän takapäästä katsottuna).

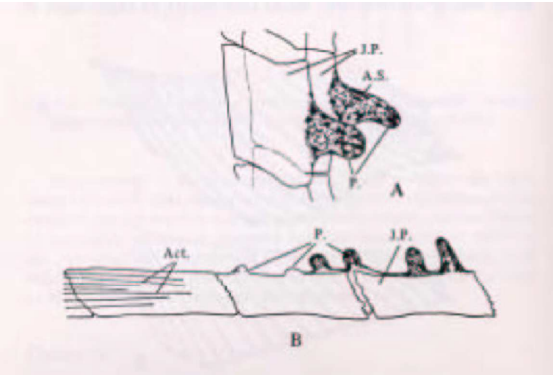
Kuva 1.

Piirros, josta näkee peräevän muotoon ja kokoon liittyvät sukupuolierot. A, uros; B, naaras. Oka, T. B. (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



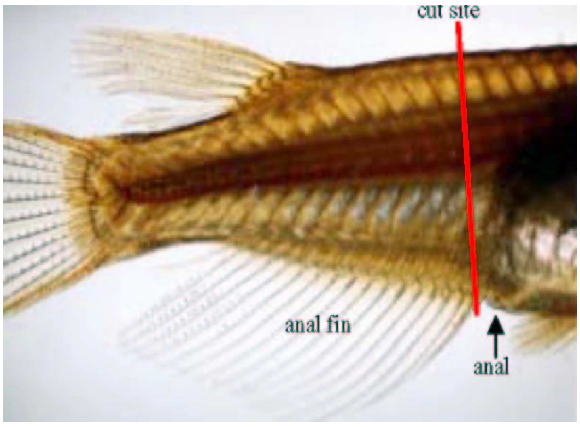
Kuva 2.

A: Peräevän eväpoimun liitoslevyissä olevia sukuelinpapilleja. J.P. = liitoslevy; A.S. = aksiaalinen väli; P. = papilli. B: Eväpoimun distaalinen pää. Actinotrichium-säikeet (Act.) ovat kärjessä. Oka, T. B. (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Kuva 3.

Kuva kalan ruumiista, jossa näkyy leikkauskohta, kun sukurauhanen on kiinnitetty muulla kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroidulla formaliinilla. Tässä tapauksessa jäljellä oleva ruumis leikataan kahtia peräevän etuosan ja peräaukon välistä partaterällä (punainen viiva). Kalan ruumiin päänpuoleinen osa laitetaan sukurauhasen kiinnitysliuokseen ja pyrstöosa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin.



Lisäys 6

SUOSITELLUT NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT VITELLOGENIINIANALYYSIA VARTEN

Näytteenotossa on oltava huolellinen koiraiden ja naaraiden vitellogeniininäytteiden välisen ristikontaminaation välttämiseksi.

Menetelmä 1A: Rasvapäämutu, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Nukutuksen jälkeen pyrstö leikataan osittain auki skalpellilla ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Kun verinäyte on otettu, plasma eristetään nopeasti sentrifugoimalla näytettä kolme minuuttia g-arvolla 15 000 (tai 4 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia g-arvolla 15 000). Haluttaessa hematokriittien prosenttiosuus voidaan määrittää sentrifugoinnin jälkeen. Sen jälkeen plasma poistetaan mikrohematokriittiputkesta ja sitä säilytetään – 80 °C:n lämpötilassa sentrifugiputkessa, jossa on 0,13 yksikköä aprotiniinia (proteaasin estäjää), siihen saakka, kunnes vitellogeniinimääritys voidaan tehdä. Rasvapäämudun (sukupuolen mukaan määräytyvän) koon mukaan kerättävä plasmamäärä on yleensä 5–60 mikrolitraa kalaa kohti (Jensen ja muut 2001).

Menetelmä 1B: Rasvapäämutu, verinäytteen otto sydämestä

Verinäyte voidaan ottaa vaihtoehtoisesti myös sydänpunktiolla, jossa käytetään heparinisoitua ruiskua (1 000 yksikköä hepariinia millilitrassa). Veri siirretään Eppendorf-putkiin (jotka pidetään jäällä) ja sentrifugoidaan (5 minuuttia, g-arvo 7 000, huonelämpötila). Plasma on siirrettävä puhtaisiin Eppendorf-putkiin (alikvooteissa, jos se on plasman tilavuuden perusteella mahdollista) ja jäädytettävä nopeasti – 80 °C:seen, jossa sitä säilytetään analysointiin saakka (Panter ja muut 1998).

Menetelmä 2A: Medaka, maksan poisto

Kalan ottaminen pois testiastiasta

(1) Kala otetaan pois testiastiasta pienen haavin avulla. Ole varovainen, ettei kala putoa muihin testiastioihin.

(2) Periaatteessa kalat on otettava pois astioista seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suurin pitoisuus ja positiivinen kontrolli. Lisäksi kaikki koiraat on otettava pois kustakin testiastiasta ennen naaraita.

(3) Kunkin kalan sukupuoli on tunnistettavissa ulkoisten sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien (kuten peräevän muodon) perusteella.

(4) Laita kala kuljetussäiliöön ja vie se työpisteeseen, jossa maksan poisto tehdään. Tarkista testiastian ja kuljetussäiliön merkintöjen oikeellisuus, jotta voit vahvistaa, että testiastiasta otettujen ja siihen jääneiden kalojen lukumäärät ovat odotuksenmukaisia.

(5) Jos kalan sukupuolta ei voi määrittää ulkonäön perusteella, ota kaikki kalat pois testiastiasta. Tässä tapauksessa sukupuoli on määritettävä tutkimalla sukurauhasia tai sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia stereomikroskoopilla.

Maksan poistaminen

(1) Siirrä kala kuljetussäiliöstä nukutusliuokseen pienen haavin avulla.

(2) Kun kala on nukutettu, siirrä se suodatinpaperin (tai paperipyyhkeen) päälle (tavallisilla) pinseteillä. Tartu pinseteillä kalaan sen pään molemmin puolin, jotta pyrstöosa ei rikkoonnu.

(3) Kuivaa kalan pinta vedestä suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

(4) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Tee sen jälkeen dissektiosaksilla pieni poikittainen viilto vatsan puolelle kaulan alueen ja vatsan keskiosan väliin.

(5) Laita dissektiosakset pienen viillon sisään ja avaa vatsa keskiviivaa pitkin kiduskannen pyrstönpuoleisesta päästä peräaukon kallonpuoleiseen päähän. Varo työntämästä saksia liian syvälle, jotta maksa ja sukurauhanen eivät vaurioidu.

(6) Tee seuraavat toimenpiteet stereomikroskoopin avulla.

(7) Laita kala vatsapuoli ylöspäin paperipyyhkeen päälle (myös lasista petrimaljaa tai lasista näytelevyä voi käyttää).

(8) Levitä vatsaontelon seinämiä tarkkuuspinseteillä, jotta saat sisäelimet esiin. Sisäelimet voi ottaa esiin myös poistamalla toisen puolen vatsaontelon seinämästä, jos tarpeen.

(9) Ota maksan ja sappirakon yhtyneet osat esiin käyttämällä toista tarkkuuspinsettiparia. Tartu sappitiehen ja leikkaa sappirakko irti. Ole varovainen, jotta sappirakko ei mene rikki.

(10) Tartu sen jälkeen ruokatorveen ja leikkaa ruoansulatuskanava irti maksasta samalla tavalla. Ole varovainen, jotta ruoansulatuskanavan sisältö ei vuoda ulos. Irrota ruoansulatuskanavan pyrstönpuoleinen osa peräaukosta ja ota kanava pois vatsaontelosta.

(11) Poista rasva ja muut kudokset maksan reunoilta. Varo naarmuttamasta maksaa.

(12) Tartu maksan porttialueeseen tarkkuuspinseteillä ja ota maksa pois vatsaontelosta.

(13) Aseta maksa näytelevylle. Poista tarvittaessa maksan pinnalta tarkkuuspinseteillä kaikki mahdollinen rasva ja ulkopuoliset kudokset (esimerkiksi vatsakalvo).

(14) Punnitse maksa elektronisella analyysivaa'alla käyttäen 1,5 ml:n mikroputkea taarana. Merkitse paino lomakkeeseen (lukema: 0,1 mg). Varmista, että mikroputken etiketissä on oikeat tiedot.

(15) Sulje maksan sisältävä mikroputki tulpalla. Aseta putki jäähdytystelineeseen (tai jäätelineeseen).

(16) Kun yhdeltä kalalta on poistettu maksa, puhdista dissektiovälineet tai vaihda ne puhtaisiin.

(17) Poista maksa kaikilta kuljetussäiliössä olevilta kaloilta edellä kuvatulla tavalla.

(18) Kun kaikilta kuljetussäiliön kaloilta (ts. kaikilta testiastian koirailta tai naarailta) on poistettu maksa, laita kaikki maksanäytteet putkitelineeseen, varmista, että putkissa on tunniste-etiketit ja laita putkiteline sen jälkeen pakastimeen. Jos maksat toimitetaan esikäsittelyyn heti niiden irrottamisen jälkeen, näytteet on kuljetettava seuraavaan työpisteeseen jäähdytystelineessä (tai jäätelineessä).

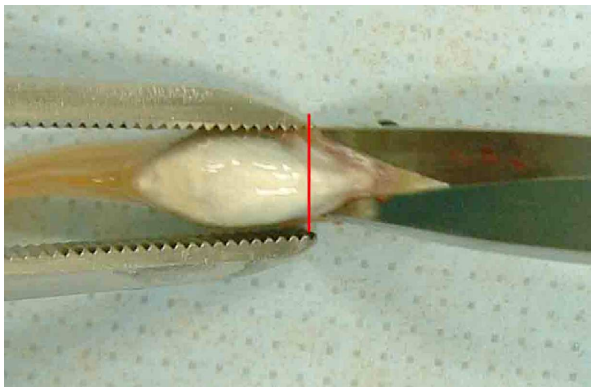
Maksan irrottamisen jälkeen kalan ruumiista voi tutkia sukurauhasten histopatologian ja mitata sekundaariset sukupuoliominaisuudet.

Näyte

Säilytä kaloilta otetut maksanäytteet – 70 °C:n lämpötilassa, jos niitä ei käytetä esikäsittelyyn pian irrottamisen jälkeen.

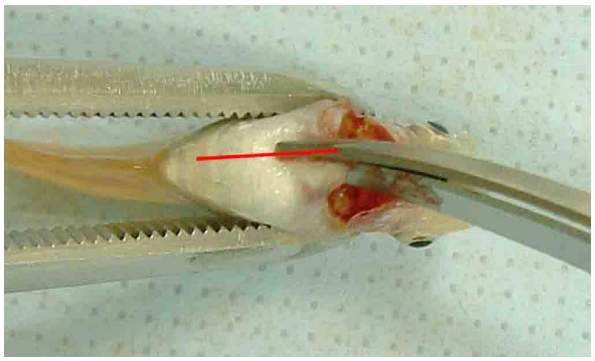
Kuva 1

Viilto tehdään saksilla aivan rintaevien edestä.



Kuva 2

Vatsan keskiviiva leikataan saksilla auki pisteeseen, joka sijaitsee noin kaksi millimetriä kallosta peräaukkoon päin.

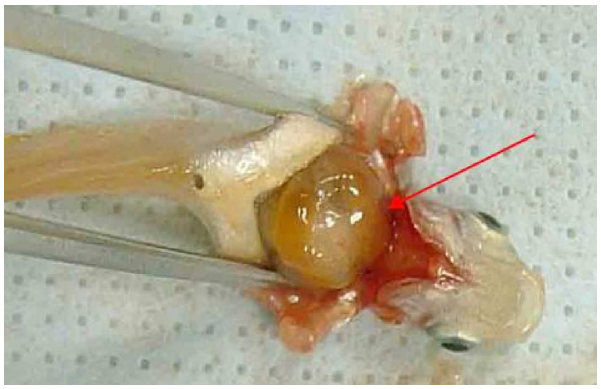


Kuva 3

Vatsaontelon seinämät levitetään pihdeillä, jotta maksa ja muut sisäelimet saadaan esiin.

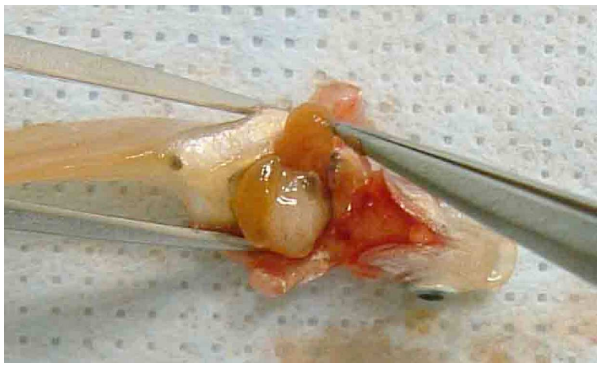
(Vaihtoehtoisesti seinämät voidaan kiinnittää sivuille.)

Nuoli osoittaa maksaa.



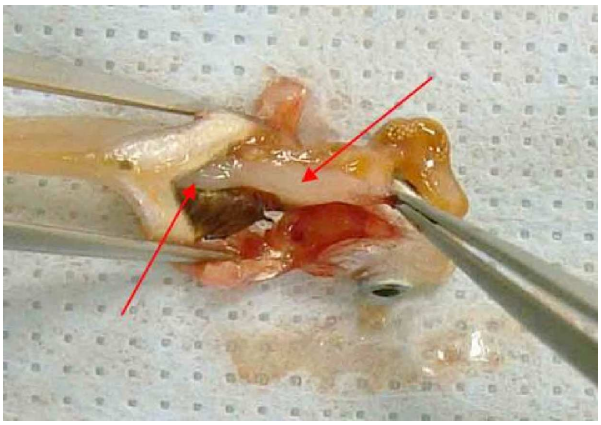
Kuva 4

Maksa leikataan irti suoraan ja otetaan pois pihdeillä.



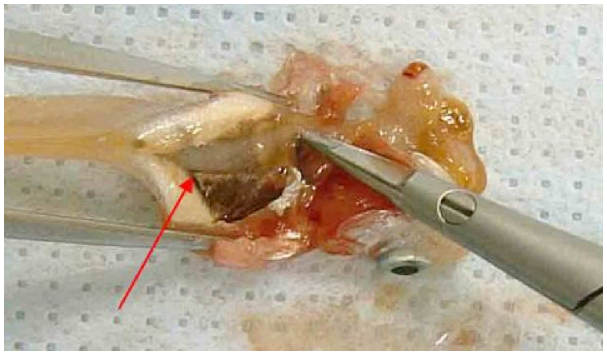
Kuva 5

Sisäelimet irrotetaan varovasti pihdeillä.



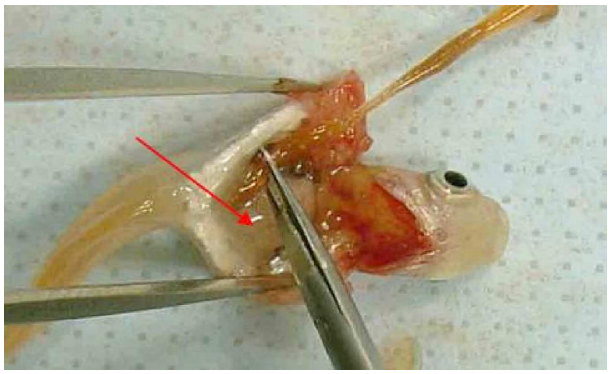
Kuva 6

Sisäelinten molemmat päät ja mahdolliset suoliliepeen kiinnikkeet leikataan irti saksilla.



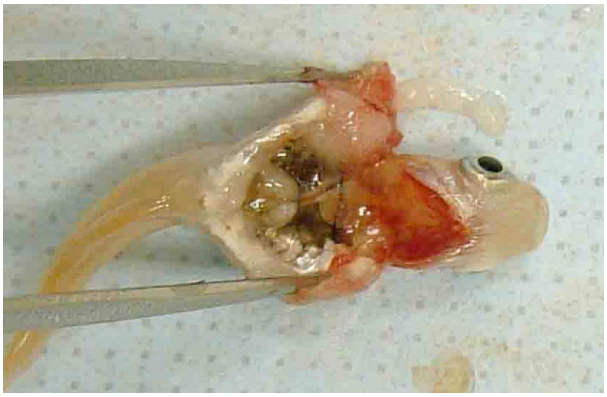
Kuva 7 (naaras)

Menettely on naaraiden osalta samanlainen.



Kuva 8

Toimenpide on valmis.



Menetelmä 2 B: Medaka (*Oryzias latipes*), maksan esikäsittely vitellogeniinialyysia varten

Ota homogenaattipuskuria sisältävä pullo ELISA-pakkauksesta ja jäähdytä se jäämurskalla (liuoksen lämpötila: ≤ 4 °C). Jos käytetään EnBio ELISA -järjestelmän homogenaattipuskuria, sulata liuos huoneenlämmössä ja jäähdytä pullo sen jälkeen jäämurskalla.

Laske tarvittavan homogenaattipuskurin määrä maksan painon perusteella (lisää 50 µl homogenaattipuskuria maksan painomilligrammaa kohti). Esimerkki: jos maksa painaa 4,5 mg, tarvittavan homogenaattipuskurin määrä on 225 µl. Tee luettelo kutakin maksaa varten tarvittavan homogenaattipuskurin määrästä.

Maksan valmistelu esikäsittelyä varten

(1) Ota maksan sisältävä 1,5 ml:n putki pakastimesta juuri ennen esikäsittelyä.

(2) Koiraiden maksojen esikäsittely on tehtävä ennen naaraiden maksojen käsittelyä vitellogeniinikontaminaation välttämiseksi. Lisäksi testiryhmät esikäsitellään seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suurin pitoisuus ja positiivinen kontrolli.

(3) Pakastimesta ei saa ottaa enempää maksanäytteitä sisältäviä 1,5 ml:n mikroputkia kuin yhdellä kerralla voidaan sentrifugoida.

(4) Laita näytteet sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäätelineeseen näytenumeroiden mukaiseen järjestykseen (maksanäytteitä ei tarvitse sulattaa).

Esikäsittely

1) Homogenaattipuskurin lisääminen

Tarkista luettelosta, kuinka paljon homogenaattipuskuria kutakin maksanäytettä kohti on käytettävä ja säädä mikropipetti (vaihteluväli: 100–1 000 µl) tarvittavan määrän mukaisesti. Kiinnitä mikropipettiin puhdas kärki.

Ota homogenaattipuskuri reagenssipullosta ja lisää puskuri maksanäytteen sisältävään 1,5 ml:n mikroputkeen.

Lisää edellä kuvatun menettelyn mukaisesti homogenaattipuskuri kaikkiin 1,5 ml:n mikroputkiin, jotka sisältävät maksanäytteen. Mikropipettiin ei tarvitse vaihtaa välillä uutta kärkeä, paitsi jos kärki kontaminoituu tai jos epäilet sen kontaminoituneen.

2) Maksan homogenisointi

— Kiinnitä mikroputkihomogenisaattoriin uusi homogenisointipää.

— Työnnä pää 1,5 ml:n mikroputkeen. Pidä homogenisaattoria siten, että maksa puristuu pään pinnan ja 1,5 ml:n mikroputken seinän väliin.

— Käytä homogenisaattoria 10–20 sekunnin ajan. Jäähdytä 1,5 ml:n mikroputkea jäämurskalla toimenpiteen ajan.

— Nosta homogenisointipää 1,5 ml:n mikroputkesta ja anna sen levätä noin 10 sekuntia. Tarkasta suspension tila sen jälkeen silmämääräisesti.

— Jos suspensiossa näkyy maksan palasia, toista vaiheet 3 ja 4 hyväksyttävän maksahomogenaatin saamiseksi.

— Jäähdytä suspendoitua maksahomogenaattia jäätelineessä sentrifugointiin saakka.

— Vaihda homogenisaattoriin uusi pää jokaista homogenaattia varten.

— Homogenisoi kaikki maksat homogenaattipuskurilla edellä kuvatun menetelmän mukaisesti.

3) Suspendoidun maksahomogenaatin sentrifugointi

— Tarkista, että jäähdyttävän sentrifugikammion lämpötila on 5 °C.

— Laita suspendoidun maksahomogenaatin sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäähdyttävään sentrifugiin (säädä tasapaino tarvittaessa).

— Sentrifugoi suspendoituja maksahomogenaatteja 5 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia g-arvolla 13 000. Jos supernatanttien erottelu on kuitenkin riittävä, keskipakoisvoimaa ja sentrifugointiaikaa voi tarvittaessa säätää.

— Tarkista sentrifugoinnin jälkeen, että supernatanttien erottelu on riittävä (pintakerros: lipidit, välikerros: supernatantti, pohjakerros: maksakudos). Jos erottelu ei ole riittävä, sentrifugoi suspensio uudestaan samoissa olosuhteissa.

— Ota kaikki näytteet pois jäähdyttävästä sentrifugista ja aseta ne jäätelineeseen näytenumeron mukaiseen järjestykseen. Varo suspendoimasta eroteltuja kerroksia uudestaan sentrifugoinnin jälkeen.

4) Supernatantin kerääminen

— Laita putkitelineeseen neljä 0,5 ml:n mikroputkea supernatantin säilyttämistä varten.

— Ota mikropipetillä 30 µl jokaisesta supernatantista (joka on eroteltu välikerrokseen) ja tyhjennä määrä yhteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

— Kerää supernatantti ja tyhjennä se kahteen muuhun 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

— Kerää loput supernatantista mikropipetillä (jos mahdollista: ≥ 100 µl). Tyhjennä tämä määrä neljänteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

— Sulje 0,5 ml:n mikroputkien päät tulpalla ja kirjoita supernatantin määrä etikettiin. Jäähdytä mikroputket välittömästi jäätelineessä.

— Vaihda mikropipettiin uusi kärki jokaista supernatanttia varten. Jos kärkeen kiinnittyy suuri määrä lipidejä, vaihda se uuteen välittömästi, jotta rasva ei kontaminoi maksanäytettä.

— Tyhjennä kaikki sentrifugoidut supernatantit neljään 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

— Kun olet tyhjentänyt supernatantin 0,5 ml:n mikroputkiin, laita kaikki etiketöidyt putket putkitelineeseen ja pakasta ne välittömästi. Jos vitellogeniinipitoisuudet mitataan välittömästi esikäsittelyn jälkeen, pidä yksi 0,5 ml:n mikroputki (joka sisältää 30 µl supernatanttia) jäähdytettynä putkitelineessä ja vie se siihen työpisteeseen, jossa ELISA-määritys tehdään. Laita muut mikroputket putkitelineisiin ja pakasta ne.

— Hävitä jäämät supernatantin keräämisen jälkeen asianmukaisesti.

Näytteiden säilytys

Säilytä maksahomogenaatin supernatanttia sisältävät 0,5 ml:n mikroputket – 70 °C:ssa siihen saakka, kun niitä käytetään ELISA-määrityksessä.

Menetelmä 3A: Seeprakala, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Pyrstöön tehdään välittömästi nukutuksen jälkeen poikittainen viilto, ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Verimäärä vaihtelee 5–15 mikrolitraan kalan koon mukaan. Mikrokapillaariputkeen lisätään sama määrä aprotiniinipuskuria (6 mikrogrammaa/ml fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa), ja plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (5 minuuttia g-arvolla 600). Plasma kerätään koeputkiin ja varastoidaan – 20 °C:ssä siihen saakka, kunnes siitä analysoidaan vitellogeniini tai muut tutkittavat proteiinit.

Menetelmä 3B: Seeprakala, verinäytteen otto sydänpunktiolla

Veren koaguloitumisen ja proteiinin hajoamisen välttämiseksi näytteet otetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, joka sisältää hepariinia (1 000 yksikköä/ml) ja proteaasin estäjää, aprotiniinia (2 TIU/ml). Hepariini-ammoniumsuola ja kylmäkuivattu aprotiniini ovat puskurin suositeltavia ainesosia. Näytteenotossa suositellaan käytettäväksi ruiskua (1 ml) ja kiinteää ohutneulaa (esimerkiksi Braun Omnikan-F). Ruisku on esitäytettävä puskurilla (noin 100 mikrolitraa), jotta jokaisen kalan pieni verimäärä voidaan eluoida kunnolla. Verinäytteet otetaan sydänpunktiolla. Ensin kala on nukutettava MS-222:lla (100 mg/l). Kun anestesian taso on asianmukainen, näytteenottaja voi erottaa seeprakalan sydämensykkeen. Pidä ruiskun mäntä pienen paineen alaisena, kun punktoit sydäntä. Kerättävän veren määrä on 20–40 mikrolitraa. Sydänpunktion jälkeen veri-puskuriseos on laitettava koeputkeen. Plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (20 minuuttia; g-arvo 5 000), ja sitä on säilytettävä – 80 °C:ssa analysointiin saakka.

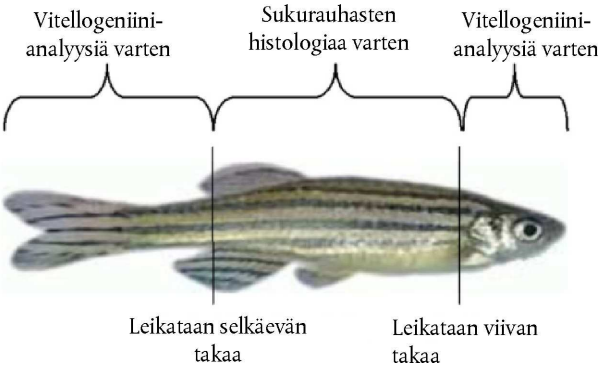
Menetelmä 3C: Menettelytapaohje – seeprakala, pään ja pyrstön homogenisointi

1. Kalat nukutetaan ja lopetetaan testikuvauksen mukaisesti.

2. Kalan pää ja pyrstö leikataan kuvassa 1 näkyvällä tavalla.

Tärkeää: *Kaikki dissektiovälineet ja leikkauspöytä on huuhdeltava ja puhdistettava kunnolla (esimerkiksi 96-prosenttisella etanolilla) jokaisen kalan käsittelyn jälkeen, jotta naaraiden tai niiden koiraiden, joille kemikaali on aiheuttanut vaikutuksia, vitellogeniini ei saastuta terveitä koiraita.*

Kuva 1



3. Jokaisen kalan pään ja pyrstön yhteispaino punnitaan lähimpään milligrammaan.

4. Punnituksen jälkeen kalan osat laitetaan asianmukaisiin putkiin (esimerkiksi 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin) ja jäädytetään – 80 °C:seen, jossa niitä säilytetään homogenisointiin saakka. Ne voidaan myös homogenisoida suoraan jäällä kahdella muovisurvimella. (Myös muita menetelmiä voi käyttää, jos ne tehdään jäällä ja lopputuloksena on homogeeninen massa.) Tärkeää: *Putket on numeroitava asianmukaisesti, jotta yhden kalan pää ja pyrstö voidaan yhdistää siihen ruumiinosaan, jota käytetään sukurauhasen histologisessa tutkimuksessa.*

5. Kun homogeeninen massa on valmis, siihen lisätään neljä kertaa kudoksen painon verran jääkylmää **homogenisointipuskuria** (*). Jatka työskentelyä survimilla, kunnes seos on homogeeninen. Tärkeä huomautus: *Jokaiselle kalalle käytetään uusia survimia.*

6. Näytteet laitetaan jäälle siihen saakka, kunnes ne sentrifugoidaan **4 °C:ssa** (g-arvo 50 000) 30 minuutin ajan.

7. Laita pipetillä 20 µl:n supernatanttiannoksia **vähintään kahteen** putkeen upottamalla pipetin kärki pinnan rasvakerroksen läpi ja vetämällä varovasti supernatanttia pipettiin ilman rasva- tai pellettifraktioita.

8. Putkia säilytetään – 80 °C:ssa siihen saakka, kunnes niitä käytetään.

(*) Homogenisointipuskuri:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-prosenttinen proteaasinestäjäsekoitus (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasinestäjäsekoitusta
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), valmistaja esimerkiksi Bie & Berntsen, Tanska
— proteaasinestäjäsekoitus: Sigman (nisäkkäiden kudoksille tarkoitettu) tuote nro P 8340
Huomaa: Homogenisointipuskuri on käytettävä samana päivänä kuin se valmistetaan. Pidä puskuri jäällä käytön aikana.

Lisäys 7

VITELLOGENIININ RIKASTUSNÄYTTEET JA MÄÄRITYSTEN VÄLINEN VERTAILUAINE

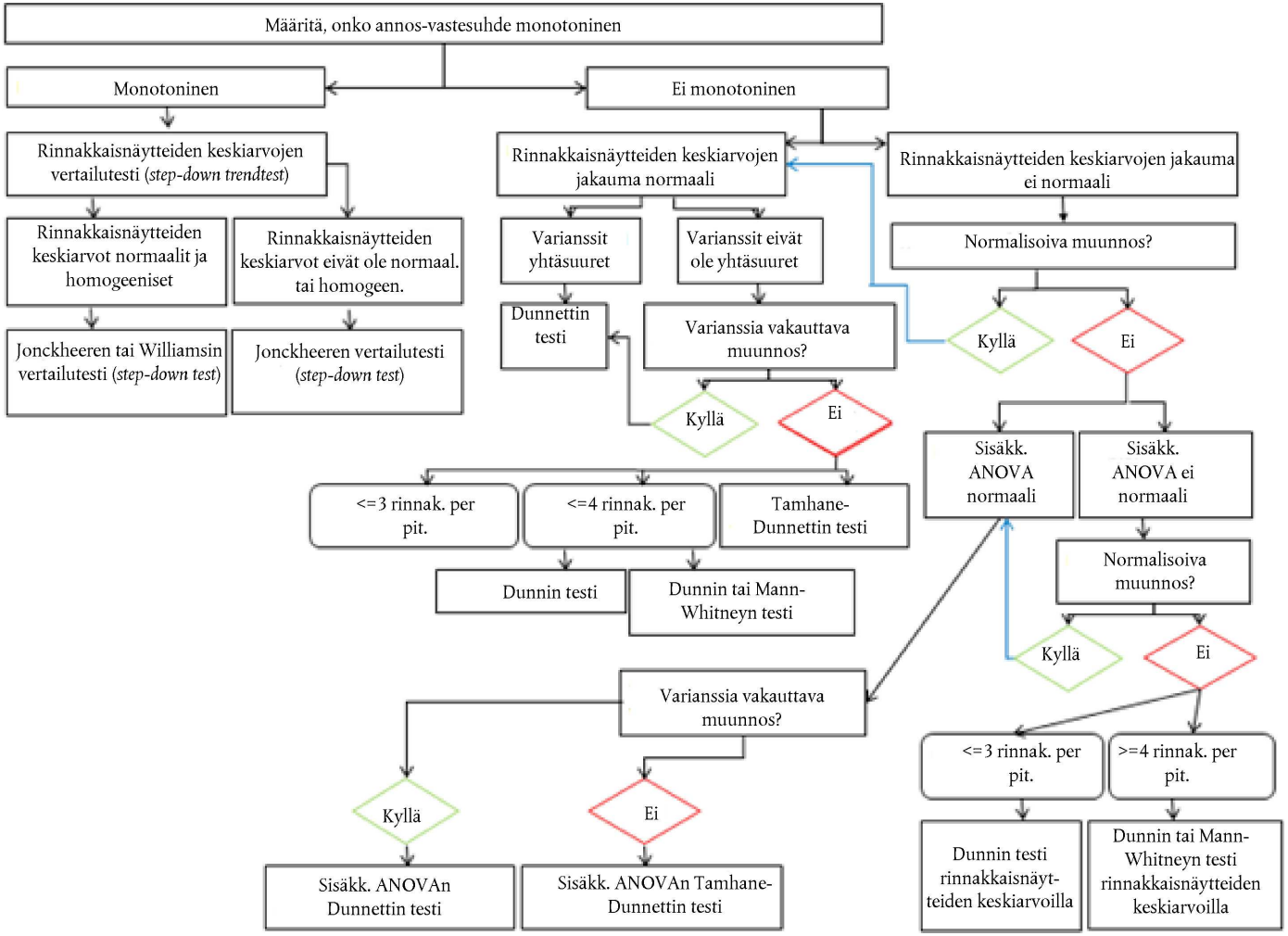
Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta. Määritysten välisen vertailuaineen valmistamisessa käytettävä vitellogeniini on peräisin eri erästä kuin se, jota käytettiin tehtävän määrityksen kalibrointistandardien tekemiseen.

Rikastusnäyte tehdään lisäämällä tunnettu määrä määritysten välistä vertailuainetta kontrollikoiraan plasmanäytteeseen. Näytettä rikastetaan, jotta saadaan sellainen vitellogeniinipitoisuus, joka on 10–100 kertaa suurempi kuin kontrollikoiraan odotettu vitellogeniinipitoisuus. Rikastettava kontrollikoiraan plasmanäyte voi olla peräisin yksittäiseltä kalalta, tai se voidaan yhdistää useilta kaloilta.

Rikastamattomasta kontrollikoiraan plasmasta otettu alanäyte analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Myös rikastettu näyte analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Vitellogeniinin keskimääräinen määrä kahdessa rikastamattomassa kontrollikoiraan plasmanäytteessä lisätään siihen vitellogeniinin laskettuun määrään, joka on lisätty näytteiden rikastamiseen, odotetun pitoisuuden määrittämiseksi. Tämä odotetun pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

Lisäys 8

VUOKAAVIO TILASTOLLISTA ANALYYSIA KOSKEVAN PÄÄTÖKSENTEON TUEKSI



C.49 **Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (FET-testi)**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 236 (2013). Siinä kuvataan seeprakalan (*Danio rerio*) alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskevat testi (FET-testi). Tämän testin tarkoituksena on määrittää kemikaalien akuutti toksisuus kalojen alkiokehitysvaiheille. FET-testi perustuu seeprakaloilla toteutettuihin tutkimuksiin ja validointitoimiin (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testiä on sovellettu menestyksellisesti useisiin erilaisiin kemikaaleihin, joiden vaikutustavat, liukoisuudet, haihtuvuudet ja hydrofobisuudet vaihtelevat (tätä on tarkasteltu kirjallisuusviitteissä 15 ja 16).

2. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

3. Äskettäin hedelmöityneet seeprakalan munat altistetaan testikemikaalille 96 tunnin ajan. Kuolleisuuden indikaattoreina kirjataan 24 tunnin välein enintään neljä apikaalista havaintoa: i) hedelmöityneiden munien koagulaatio, ii) somiittien muodostumattomuus, iii) häntäsilmun irtoamattomuus ruskuaispussista ja iv) sydämenlyöntien puute. Altistusjakson lopussa akuutti toksisuus määritellään missä tahansa neljästä kirjatusta apikaalisesta havainnosta saadun positiivisen tuloksen perusteella ja lasketaan LC_{50}-arvo.

ALUSTAVAT HUOMIOT

4. Hyödyllisiä tietoja ainekohtaisista ominaisuuksista ovat muun muassa rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, stabiilisuus vedessä ja valossa, pK_a ja K_{ow}, vesiliukoisuus ja höyrynpaine sekä nopean biohajoavuuden testin tulokset (testimenetelmä C.4 (17) tai testimenetelmä C.29 (18)). Liukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää haihtumisen vuoksi testin aikana. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja määritysrajaltaan tunnettu sopiva analyyttinen menetelmä aineen määrittämiseksi kvantitatiivisesti testiliuoksissa.

5. Jos testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen, seoksen koostumus olisi luonnehdittava mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja ainekohtaisten erityisominaisuuksien avulla (ks. 4 kohta). Ennen kuin testimenetelmää käytetään lainsäädännössä edellytettyyn seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset lainsäädännön tavoitteen kannalta..

6. Metabolian avulla aktivoitavissa olevien aineiden osalta on näyttöä siitä, että seeprakalojen alkioilla on biotransformaatiokykyjä (19) (20) (21) (22). Alkiovaiheessa olevien kalojen metabolointikyky ei kuitenkaan aina ole sama kuin kalanpoikasten tai täysikasvuisten kalojen metabolointikyky. Esimerkiksi protoksista allyylialkoholia (9) ei ole havaittu FET-testissä. Jos on viitteitä siitä, että metaboliitit tai muut merkitykselliset hajoamistuotteet saattavat olla myrkyllisempiä kuin alkutuote, suositellaan tästä syystä, että testi suoritetaan myös näillä metaboliiteilla/hajoamistuotetilla ja myös näitä tuloksia käytetään tehtäessä johtopäätöksiä testikemikaalin toksisuudesta tai että vaihtoehtoisesti suoritetaan toinen testi, jossa metabolointi otetaan paremmin huomioon.

7. Alkioiden ei odoteta olevan herkkiä aineille, joiden molekyylipaino on ≥ 3kDa, aineille, joilla on hyvin tilaa vievä molekyylirakenne sekä aineille, jotka viivästyttävät kuoriutumista ja saattavat estää kuoriutumisen jälkeisen altistumisen tai vähentää sitä, aineiden rajallisen biologisen hyödynnettävyyden vuoksi, ja muut toksisuustestit saattavat olla asianmukaisempia.

TESTIN VALIDITEETTI

8. Testitulokset ovat valideja, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

   a) Kaikkien kerättyjen munien kokonaishedelmöitymisasteen on oltava ≥ 70 prosenttia testattavassa erässä.

b) Veden lämpötilan testauskammioissa on oltava 26 ± 1 °C koko testin ajan.

c) Alkioiden eloonjäämisasteen negatiivisessa kontrollissa (laimennusvesi) ja tarvittaessa liuotinkontrollissa on oltava ≥ 90 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen loppuun asti.

d) Altistuksen positiiviselle kontrollille (seeprakalojen osalta esimerkiksi 4,0 mg/l 3,4-dikloorianiliinia) kuolleisuuden on oltava vähintään 30 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa.

e) Kuoriutumisasteen on negatiivisessa kontrollissa (ja tarvittaessa liuotinkontrollissa) oltava ≥ 80 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa.

f) Veteen liuenneen hapen pitoisuuden negatiivisessa kontrollissa ja suurimman testipitoisuuden on oltava 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa ≥ 80 prosenttia kyllästymisarvosta.

MENETELMÄN KUVAUS

9. Yhteenveto suositelluista ylläpito- ja testiolosuhteista on lisäyksessä 2.

Laitteisto

10. Menetelmässä tarvitaan seuraavat laitteet:

a) kalasäiliöitä, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia (esimerkiksi lasia) ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaustiheyteen (ks. ”Syöttökalojen ylläpito”, 14 kohta)

b) vähintään 80-kertaisesti suurentava käänteismikroskooppi ja/tai kaksiokulaarinen mikroskooppi; jos havaintojen kirjaamiseen käytettävän tilan lämpötilaa ei voida säätää 26 ± 1 celsiusasteeseen, tarvitaan lämpötilakontrolloitu näytepöytä tai muita lämpötilan ylläpitokeinoja

c) testauskammiot; esimerkiksi tavanomaisia 24-kuoppalevyjä, joiden syvyys on noin 20 mm (ks. ”Testauskammiot”, 11 kohta)

d) esimerkiksi tarrakalvoa 24-kuoppalevyjen peittämiseen

e) inkubaattori tai ilmastoitu tila, jonka lämpötila on säädettävissä ja jonka avulla lämpötila kuopissa (tai testauskammioissa) voidaan pitää 26 ± 1 celsiusasteessa

f) ph-mittari

g) happimittari

h) laite veden kovuuden ja johtavuuden määritykseen

i) kutuastia: instrumenttitarjottimia, jotka ovat lasia, ruostumatonta terästä tai muuta inerttiä materiaalia; mätimunia suojaava verkko (silmäkoko 2 ± 0,5 mm), joka on ruostumatonta terästä tai muuta inerttiä materiaalia; kutualusta (esimerkiksi inertistä materiaalista valmistettuja keinotekoisia kasveja (testimenetelmä C.48, lisäys 4a (23))

j) suurikärkisiä pipettejä mätimunien keräämiseen

k) lasiastioita eri testipitoisuuksien ja laimennusveden valmistamiseen (dekantterilaseja, mitta-asteikoilla varustettuja pulloja, mittalaseja ja pipettejä) tai seeprakalan munien keräämiseen (esimerkiksi dekantterilaseja, kiteytysmaljoja)

l) jos testin suorittamiseen käytetään vaihtoehtoisia altistusjärjestelmiä, kuten läpivirtausjärjestelmää (24) tai passiivista annostelua (25), tarvitaan asianmukaiset tilat ja laitteet.

Testiastiat

11. On käytettävä lasista tai polystyreenistä valmistettuja testiastioita (esimerkiksi 24-kuoppalevyjä, joissa kunkin kuopan täyttötilavuus on 2,5–5 ml). Jos epäillään (esimerkiksi ei-polaaristen, rakenteeltaan tasomaisten aineiden, joilla on korkea K_{OW}-arvo) adsorboitumista polystyreeniin, on käytettävä inerttejä materiaaleja (lasi) adsorboitumisesta aiheutuvan häviämän vähentämiseksi (26). Testiastiat on sijoitettava inkubaattoriin sattumanvaraiseen järjestykseen.

Vesi ja koeolosuhteet

12. Ylläpitovesi suositellaan laimennettavan siten, että saavutetaan useille erilaisille pintavesille tyypillinen kovuustaso. Laimennusvesi on valmistettava synteettisestä vedestä (27). Tuloksena saatavan kovuusarvon on oltava 100–300 mg/l $CaCO_3$, jotta estetään kalsiumkarbonaatin liiallinen saostuminen. Myös muuta hyvin kuvattua pinta- tai lähdevettä voidaan käyttää. Synteettinen vesi voidaan mukauttaa kovuudeltaan alhaiseksi ylläpitovedeksi laimentamalla sitä deionisoidulla vedellä enintään suhteessa 1:5 vähimmäiskovuuteen 30–35 mg/l $CaCO_3$. Vesi ilmastetaan happikyllästykseen asti ennen testikemikaalin lisäämistä. Lämpötilan kuopissa on oltava 26 ± 1 °C koko testin ajan. pH-arvon on oltava 6,5–8,5 ja se saa vaihdella tämän vaihteluvälin sisällä enintään 1,5 yksikköä testin aikana. Jos pH-arvon ei odoteta pysyvän tämän vaihteluvälin sisällä, pH-arvoa on säädettävä ennen testin aloittamista. pH-arvoa on säädettävä siten, että se ei muuta kantaliuoksen pitoisuutta merkittävästi eikä aiheuta testikemikaalin kemiallisia reaktioita tai saostumista. Vetykloridin (HCl) ja natriumhydroksidin (NaOH) käyttöä testikemikaalia sisältävien liuosten pH-arvon korjaamiseen suositellaan.

Testiliuokset

13. Testiliuosten halutut pitoisuudet voidaan valmistaa esimerkiksi laimentamalla kantaliuosta. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testikemikaali laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista ja/tai ultraääntä). Vaikeasti veteen liukenevien testikemikaalien yhteydessä tulee noudattaa vaikeasti testattavia aineita ja seoksia koskevaa OECD:n ohjeasiakirjaa nro 23 (28). Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä tulee välttää, mutta se voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi. Kun kantaliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotinta, sen loppupitoisuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 100 µl/l, ja pitoisuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa. Liuottimen käyttö edellyttää ylimääräistä liuotinkontrollia.

Emokalojen ylläpito

14. Mätimunien tuotantoon käytetään altistamattomien villien seeprakalojen kutukantaa, jonka munien hedelmöitymisaste on hyvin dokumentoitu. Kaloilla ei saa olla makroskooppisesti havaittavia tulehduksen ja sairauden oireita eikä niitä saa olla hoidettu lääkkeillä (akuutisti tai profylaktisesti) kutua edeltävien kahden kuukauden aikana. Emokaloja ylläpidetään akvaarioissa, joiden suositeltu tilavuus on 1 l vettä kalaa kohti ja kiinteä valoisa aika 12–16 tuntia (29) (30) (31) (32) (33). Optimaaliset suodatusnopeudet on säädettävä; liiallisia suodatusnopeuksia, jotka aiheuttavat veden voimakasta sekoittumista, on vältettävä. Tietoja ruokintaolosuhteista on lisäyksessä 2. Liiallista ruokintaa on vältettävä ja veden laatua ja akvaarioiden puhtautta on valvottava säännöllisesti ja ne on palautettava tarvittaessa alkuperäiseen tilaan.

Pätevyyden testaaminen

15. 3,4-dikloorianiliiniä (jota on käytetty validointitutkimuksissa (1) (2)) on testattava vertailukemikaalina mieluiten kahdesti vuodessa pitoisuus-vastesuhteen koko vaihteluvälillä käytetyn kalakannan herkkyyden tarkistamiseksi. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen on käytettävä vertailukemikaalia. Laboratorio voi käyttää tätä kemikaalia osoittaakseen teknisen pätevyytensä määritysmenetelmän suorituksessa ennen kuin se toimittaa tuloksia sääntelytarkoituksiin.

Mätimunien tuotanto

16. Seeprakalan munia voidaan tuottaa kuturyhmissä (yksittäisissä kututankeissa) tai massakudun avulla (ylläpitotankeissa). Jos käytetään kuturyhmiä, ryhmän koiraat ja naaraat (esimerkiksi suhteessa 2:1) laitetaan kututankkeihin muutama tunti ennen pimeän tuloa testiä edeltävänä päivänä. Koska seeprakalojen kuturyhmät saattavat joskus jättää kutematta, suositellaan vähintään kolmen kututankin käyttämistä samanaikaisesti. Geneettisen vinouman välttämiseksi mätimunat kerätään vähintään kolmesta kuturyhmästä, sekoitetaan ja valitaan satunnaisesti.

17. Mätimunien keräämiseksi kutuastioita sijoitetaan kututankkeihin tai ylläpitotankkeihin ennen valon sammuttamista testiä edeltävänä päivänä tai ennen valon sytyttämistä testipäivänä. Jotta täysikasvuiset seeprakalat eivät voi syödä munia, kutuastiat peitetään inertistä materiaalista valmistetuilla verkoilla, joiden silmäkoko on sopiva (noin 2 ± 0,5 mm). Keinotekoisia kasveja, jotka ovat inerttiä materiaalia (esimerkiksi muovia tai lasia), voidaan kiinnittää verkkoon kudun stimuloimiseksi, jos tämän katsotaan olevan tarpeen (3) (4) (5) (23) (35). Tässä on käytettävä kuluneita muovimateriaaleja, jotka eivät liukene (esimerkiksi ftalaatit). Pariutuminen, kuteminen ja hedelmöityminen tapahtuvat 30 minuutin kuluessa valon sytyttämisestä, ja kutuastiat, joissa kerätyt mätimunat ovat, voidaan poistaa varovasti. Mätimunat suositellaan huuhdeltavan synteettisellä vedellä sen jälkeen, kun ne on kerätty kutuastioista.

Mätimunien erottelu

18. Lämpötilassa 26 °C hedelmöityneet munat jakautuvat ensimmäisen kerran noin 15 minuutin kuluttua, ja seuraavissa synkronisissa jakautumisissa muodostuu 4-, 8-, 16- ja 32-soluisia blastomeerejä (ks. lisäys 3) (35). Näissä vaiheissa hedelmöityneet munat voidaan tunnistaa selvästi blastulan kehittymisen perusteella.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

19. Testikemikaalille altistetaan 20 alkiota pitoisuutta kohti (yksi alkio kussakin kuopassa). Altistuminen on toteutettava siten, että ± 20 prosenttia kemikaalin nimellispitoisuudesta pidetään yllä koko testin ajan. Jos tämä ei ole mahdollista staattisessa järjestelmässä, on sovellettava helposti käsiteltävää semistaattista vaihtoväliä (esimerkiksi testikemikaalin vaihtaminen 24 tunnin välein). Näissä tapauksissa altistumispitoisuudet on todennettava vähintään suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista kunkin altistumisvälin alussa ja lopussa (ks. 36 kohta). Jos altistumispitoisuutta, joka on ± 20 prosenttia nimellispitoisuuksista, ei voida pitää yllä, kaikki pitoisuudet on mitattava kunkin altistumisvälin alussa ja lopussa (ks. 36 kohta). Vaihtamisen yhteydessä on huolehdittava siitä, että pieni määrä vanhaa testiliuosta peittää alkiot koko ajan, jotta ne eivät kuivu. Testiä voidaan mukauttaa vastaamaan tiettyjen aineiden testausta koskevia vaatimuksia (esimerkiksi läpivirtausjärjestelmät (24) tai passiiviset annostelujärjestelmät (25) helposti hajoavia tai hyvin adsorboituvia aineita varten (29) tai muut järjestelmät haihtuvia aineita varten (36) (37)). Joka tapauksessa olisi huolehdittava siitä, että alkioille aiheutetaan mahdollisimman vähän stressiä. Testikammiot on sopeutettava vähintään 24 tunnin ajan testiliuoksilla ennen testin aloittamista. Yhteenveto testiolosuhteista on lisäyksessä 2.

Testipitoisuudet

20. Tilastollisen vaatimusten täyttämiseksi tarvitaan tavallisesti viisi testikemikaalin pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 2,2-kertainen. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Suosituksena on, että suurin testattava pitoisuus johtaa 100 prosentin kuolleisuuteen ja että pienin testattava pitoisuus ei aiheuta havaittavaa vaikutusta 28 kohdan mukaisesti. Ennen varsinaista koetta tehtävällä alueenmäärityskokeella voidaan valita asianmukainen pitoisuusalue. Alueenmäärityskoe tehdään tavallisesti kymmenellä alkiolla pitoisuutta kohti. Seuraavat ohjeet koskevat kokeen suorittamista 24-kuoppalevyissä. Jos käytetään erilaisia testauskammioita (esimerkiksi pieniä Petri-maljoja) tai testataan useampia pitoisuuksia, ohjeita on mukautettava vastaavasti.

21. Yksityiskohtaisia ja visuaalisia ohjeita pitoisuuksien jakamiseksi eri 24-kuoppalevyihin on 27 kohdassa sekä lisäyksessä 4 olevassa kuvassa 1.

Kontrollit

22. Laimennusvesikontrolleja tarvitaan sekä negatiivisena kontrollina että levyjen sisäisinä kontrolleina. Jos levyn sisäisessä kontrollissa havaitaan enemmän kuin yksi kuollut alkio, levy hylätään, mikä vähentää LC_{50}-arvon määrittämisessä käytettyjen pitoisuuksien määrää. Jos koko levy hylätään, havaittujen vaikutusten arvioiminen ja erottaminen vaikeutuu, varsinkin jos hylätty levy on liuotinkontrollilevy tai levy, jossa on myös käsiteltyjä alkioita. Ensin mainitussa tapauksessa koe on toistettava. Jälkimmäisessä tapauksessa kokonaisen käsitellyn ryhmän (tai ryhmien) menettäminen sisäisen kontrollin kuolleisuuden vuoksi saattaa rajoittaa kykyä arvioida vaikutuksia ja määrittää LC_{50}-arvoja.

23. Kunkin testauksessa käytetyn munaerän osalta suoritetaan positiivinen kontrolli vakiopitoisuudella 4 mg/l 3,4-dikloorianiliinia.

24. Jos käytetään liuotinta, 20 alkion lisäryhmä altistetaan liuottimelle erillisellä 24-kuoppalevyllä, joka toimii liuotinkontrollina. Jotta testi voidaan katsoa hyväksyttäväksi, on osoitettava, että liuottimella ei ole merkittävää vaikutusta kuoriutumisaikaan ja eloonjäämiseen eikä se aiheuta mitään muita haittavaikutuksia alkioille (vrt. 8 kohdan c alakohta).

Altistuksen aloittaminen ja testin kesto

25. Testi aloitetaan mahdollisimman pian munien hedelmöitymisen jälkeen ja se päättyy 96 tunnin altistuksen jälkeen. Alkiot upotetaan testiliuoksiin ennen alkiolevyn jakaantumisvaihetta tai viimeistään 16 solun vaiheessa. Altistuksen aloittamiseksi mahdollisimman pian valitaan satunnaisesti vähintään kaksi kertaa kutakin käsiteltävää ryhmää tarvittava määrä munia ja ne siirretään eri pitoisuuksiin ja kontrolleihin (esimerkiksi 100 ml:n kiteytysmaljoihin; munien on oltava täysin upotettuina) viimeistään 90 minuuttia hedelmöitymisen jälkeen.

26. Elinkykyiset hedelmöityneet munat erotetaan hedelmöittymättömistä munista ja siirretään 24 tunnin ajan esikäsiteltyihin 24-kuoppalevyihin, joihin kaadetaan 2 ml vastavalmistettua testiliuosta kuoppaa kohti 180 minuutin kuluessa hedelmöitymisestä. Stereomikroskoopin (mieluiten ≥ 30-kertainen suurennus) avulla valitaan hedelmöityneet munat, jotka jakautuvat eivätkä osoita selviä epänormaaleja ilmiöitä jakautumisen aikana (esimerkiksi asymmetria, vesikkelien muodostuminen) tai korionin vaurioita. Munien keräämisestä ja erottelusta katso lisäyksessä 3 olevat kuvat 1 ja 3 sekä lisäyksessä 4 oleva kuva 2.

Mätimunien jakaminen 24-kuoppalevyihin

27. Mätimunat jaetaan kuoppalevyihin seuraavasti (ks. myös lisäyksessä 4 oleva kuva 1):

— 20 munaa yhdelle levylle kutakin testipitoisuutta kohti

— 20 munaa liuotinkontrollina yhdelle levylle (tarvittaessa)

— 20 munaa positiivisena kontrollina yhdelle levylle

— 4 munaa laimennusvedessä sisäisenä levykontrollina jokaiselle edellä mainituista levyistä

— 24 munaa laimennusvedessä negatiivisena kontrollina yhdelle levylle.

Havainnot

28. Kustakin testatusta alkiosta tehdään seuraavat apikaaliset havainnot: alkioiden koaguloituminen, somiittien muodostumattomuus, hännän irtoamattomuus ja sydämenlyöntien puute (taulukko 1). Näitä havaintoja käytetään kuolleisuuden määrittämiseen: positiivinen tulos jossain näistä havainnoista merkitsee sitä, että seeprakalan alkio on kuollut. Lisäksi kuoriutuminen kirjataan käsitellyissä ja kontrolliryhmissä päivittäin 48 tunnin jälkeen. Havainnot kirjataan 24 tunnin välein testin loppuun asti.

Taulukko 1

Akuuttia toksisuutta koskevat apikaaliset havainnot seeprakalojen alkioissa 24–96 tuntia hedelmöittymisen jälkeen

	Altistusajat			
	24 tuntia	48 tuntia	72 tuntia	96 tuntia
Koaguloituneet alkiot	+	+	+	+
Somiittien muodostumattomuus	+	+	+	+
Hännän irtoamattomuus	+	+	+	+
Sydämenlyöntien puute		+	+	+

29. *Alkion koaguloituminen:* Koaguloituneet alkiot ovat maidonvalkeita ja näkyvät mikroskoopissa tummina (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 1). Koaguloituneiden alkioiden määrä lasketaan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

30. *Somiittien muodostumattomuus:* Lämpötilassa 26 ± 1 °C normaalisti kehittyvässä seeprakalan alkiossa on 24 tunnin jälkeen muodostunut noin 20 somiittia (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 2). Normaalisti kehittynyt alkio liikkuu spontaanisti (sivuttaissuuntaisia supistuksia). Spontaanit liikkeet ovat osoitus somiittien muodostumisesta. Somiittien puuttuminen kirjataan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen. Somiittien muodostumattomuus 24 tunnin jälkeen saattaa johtua kehityksen yleisestä hidastumisesta. Viimeistään 48 tunnin jälkeen somiitteja pitäisi olla muodostunut. Jos näin ei ole, alkiot katsotaan kuolleiksi.

31. *Hännän irtoamattomuus:* Normaalisti kehittyvissä seeprakalojen alkioissa hännän havaitaan irtoavan (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 3) ruskuaisesta alkion takaosan pidennyttyä. Hännän irtoamattomuus kirjataan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

32. *Sydämenlyöntien puute:* Normaalisti kehittyvissä seeprakalojen alkioissa sydämenlyönnit näkyvät 26 ± 1 °C lämpötilassa 48 tunnin jälkeen (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 4). Tämän päätepisteen kirjaamisessa on oltava erityisen huolellinen, sillä epäsäännöllisiä sydämenlyöntejä *ei* saa kirjata letaalina päätepisteenä. Lisäksi näkyviä sydämenlyöntejä ilman verenkiertoa vatsa-aortassa ei katsota letaaliksi päätepisteeksi. Tämän päätepisteen kirjaamiseksi alkioita, joilla ei havaita sydämenlyöntejä, on havainnoitava vähintään 80-kertaisella suurennuksella vähintään minuutin ajan. Sydämenlyöntien puute kirjataan 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

33. Kaikkien käsiteltyjen ryhmien ja kontrolliryhmien kuoriutumisasteet on kirjattava 48 tunnista lähtien ja raportoitava. Vaikka kuoriutuminen ei ole LC_{50}-arvon laskennassa käytettävä päätepiste, se varmistaa alkion altistumisen ilman korionin suojaavaa vaikutusta ja voi siten auttaa tietojen tulkinnassa.

34. Yksityiskohtaisia kuvauksia seeprakalan alkioiden normaalista (35) kehityksestä ja esimerkkejä epänormaalista kehityksestä esitetään lisäyksissä 3 ja 5.

Mittaukset

35. Testin alussa ja lopussa määritetään pH, kokonaiskovuus ja johtavuus kontrollissa (tai kontrolleissa) ja testikemikaalin suurimmassa pitoisuudessa. Semistaattisissa vaihtojärjestelmissä pH on määritettävä ennen veden vaihtamista ja sen jälkeen. Liuenneen hapen pitoisuus mitataan testin lopussa negatiivisissa kontrolleissa sekä suurimmassa testipitoisuudessa, jossa on elinkykyisiä alkioita, ja sen olisi siinä oltava testin validiteettikriteerien mukainen (ks. 8 kohdan f alakohta). Jos lämpötilan pelätään vaihtelevan eri 24-kuoppalevyjen välillä, lämpötila mitataan kolmesta satunnaisesti valitusta astiasta. Lämpötila olisi kirjattava mieluiten jatkuvasti testin ajan tai vähintään päivittäin.

36. Staattisessa järjestelmässä testikemikaalin pitoisuus on mitattava ainakin suurimmassa ja pienimmässä testipitoisuudessa, mutta mieluiten kaikissa käsittelyissä, testin alussa ja lopussa. Semistaattisissa testeissä (joissa liuokset vaihdetaan) suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa, jos testikemikaalipitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta. Jos testikemikaalin pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta, kaikki testipitoisuudet on analysoitava vasta valmistettuina sekä välittömästi ennen vaihtamista. Jos määrä ei ole riittävä analysointia varten, voi olla hyödyllistä yhdistää testiliuoksia tai käyttää korvaavia kammioita, jotka ovat samaa materiaalia kuin 24-kuoppalevyt ja joiden tilavuuden ja pinta-alan suhde on sama. On erittäin suositeltavaa määritellä tulokset mitattujen pitoisuuksien perusteella. Jos mitatut pitoisuudet eivät pysy 80–120 prosentissa nimellispitoisuudesta, vaikuttavat pitoisuudet olisi ilmaistava suhteessa mitattujen pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon; katso vaikeiden aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan luku 5 (28).

RAJA-ANNOSTESTI

37. Tässä testimenetelmässä kuvattuja menettelyjä käyttäen voidaan suorittaa raja-annostesti, jossa testikemikaalin pitoisuus on 100 mg/l tai sama kuin aineen liukoisuusraja-arvo testissä käytettävässä viljelynesteessä (sen mukaan, kumpi on alempi), sen osoittamiseksi, että LC_{50}on suurempi kuin kyseinen pitoisuus. Raja-annostesti on suoritettava 20 alkiolla käsittelyssä, positiivisessa kontrollissa ja – tarvittaessa – liuotinkontrollissa ja 24 alkiolla negatiivisessa kontrollissa. Jos kuolleisuus testatussa pitoisuudessa ylittää negatiivisen kontrollin (tai liuotinkontrollin) kuolleisuuden 10 prosentilla, on suoritettava kattava testi. Kaikki havaitut vaikutukset on kirjattava. Jos kuolleisuus negatiivisessa kontrollissa (tai liuotinkontrollissa) on suurempi kuin 10 prosenttia, testiä ei voida hyväksyä ja se on uusittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

38. Tässä testissä yksittäisiä kuoppia pidetään tilastollisen analyysin kannalta riippumattomina toistoina. Niiden alkioiden prosenttiosuus, joista ainakin yksi apikaalinen havainto on positiivinen 48 ja/tai 96 tunnin jälkeen, esitetään testipitoisuuksien funktiona. Kuvaajien kulmakertoimien, LC_{50}-arvojen ja luottamusvälin (95 prosenttia) laskemiseksi on käytettävä sopivia tilastomenetelmiä (38) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa ”Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (39).

Testiraportti

39. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

Testiorganismit:

— tieteellinen nimi, kanta, hedelmöityneiden munien toimittaja ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenettely (esimerkiksi liuos vaihtuu semistaattisissa olosuhteissa)

— valoisa aika

— koejärjestely (esimerkiksi testauskammioiden määrä, kontrollien tyyppi)

— kalojen ylläpitoon käytetyn veden laatua koskevat tiedot (esimerkiksi pH, kovuus, lämpötila, johtavuus, liuenneen hapen pitoisuus)

— testiliuosten liuenneen hapen pitoisuus, pH, kokonaiskovuus, lämpötila ja johtavuus kokeen alussa ja 96 tunnin jälkeen

— kantaliuosten ja testiliuosten valmistusmenetelmä sekä vaihtotiheys

— perustelut liuottimen käyttämiselle ja sen valinnalle, jos se on muu kuin vesi

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testikemikaalin pitoisuus koeastioissa; lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä kvantifiontiraja (LoQ)

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät yleiset eloonjäämistä koskevat validiteettivaatimukset

— munien hedelmöitymisaste

— kuoriutumisaste käsitellyissä ryhmissä ja kontrolliryhmissä.

Tulokset:

— suurin pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut kuolleisuutta kokeen aikana

— pienin pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin kuolleisuuden kokeen aikana

— kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa suositeltuina havainnointiajankohtina

— jos mahdollista LC_{50}-arvot kuolleisuudelle 96 tunnin (ja valinnaisesti 48 tunnin) kohdalla 95 prosentin luottamusrajoin

— pitoisuus/kuolleisuus -käyrä kokeen päätyttyä

— kuolleisuus kontrolleissa (negatiiviset kontrollit, levyjen sisäiset kontrollit sekä positiivinen kontrolli ja mahdollisesti käytetty liuotinkontrolli)

— tiedot kunkin neljän apikaalisen havainnon tuloksista

— mahdollisten morfologisten ja fysiologisten poikkeavuuksien esiintyvyys ja kuvaus (ks. lisäyksessä 5 olevassa kuvassa 2 esitetyt esimerkit)

— testin aikaiset tapahtumat, jotka ovat saattaneet vaikuttaa tuloksiin

— tilastollinen analyysi ja tietojen käsittely (Probit-analyysi, logistinen regressiomalli ja LC_{50}-arvojen geometrinen keskiarvo)

— (muunnetun) pitoisuus-vastekuvaajan regression kaltevuus ja luottamusväli.

Mahdolliset poikkeamat testimenetelmästä ja syyt niihin.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. ja Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: s. 87–102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: s. 38–48.

(6) Schulte, C. ja Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, s. 12–19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. ja Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: s. 2087–2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, s. 9690–9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. ja Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: s. 97–102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. ja Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: s. 401–406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: s. 878–882.

(13) Nguyen, L.T. ja Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: s. 566–571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. ja Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: s. 3024–3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. ja Carr G. J. (2013) Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32:1768–1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), s. 196-209

(17) Tämän liitteen luku C.4: Biohajoavuuden määritys

(18) Tämän liitteen luku C.29: Biohajoavuus – CO_2 suljetuissa astioissa

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: s. 25–36.

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: s. 133–141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: s. 242–249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Toxicol. 253: s. 244–252.

(23) Tämän liitteen luku C.48: Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus. Ks. lisäys 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: s. 1436–1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, s. 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, s. 1676–1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3 Flow-through method. Saatavilla osoitteessa: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: s. 121–173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. painos. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Euroopan komissio (2007): Komission suositus 2007/526/EY, annettu 18 päivänä kesäkuuta 2007, kokeellisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten säilytystä ja hoitoa koskevista ohjeista (tiedoksiannettu numerolla K(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

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

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: s. 173–181.

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. ja Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: s. 253–310.

(36) Tämän liitteen luku C.2: Daphnia sp., akuutin immobilisaation testi

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: s. 1970–1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Saatavilla osoitteessa: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. s. 298

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Apikaalinen päätepiste: aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla.

Blastula: Alkion animaalisen navan ympärillä oleva solumuodostuma, joka peittää ruskuaisen tietyn osan.

Epibolia: pääasiassa epidermaalisten solujen voimakas lisääntyminen alkion gastrulaatiovaiheessa ja niiden liikkuminen dorsaalipuolelta ventraalipuolelle, jolloin entodermaaliset solukerrokset internalisoituvat invaginaatiota muistuttavassa prosessissa ja ruskuainen siirtyy osaksi alkiota.

IUPAC: Kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Kemikaali: aine tai seos.

Levyn sisäinen kontrolli: Sisäinen kontrolli, joka muodostuu neljästä laimennusvedellä täytetystä kuopasta kutakin 24-kuoppalevyä kohti ja jolla havaitaan valmistajan tai tutkijan menettelyn aikana mahdollisesti aiheuttama levyjen kontaminaatio ja testin tulokseen mahdollisesti vaikuttavat levyjen vaikutukset (esimerkiksi lämpötilagradientti).

Läpivirtauskoe: Koe, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistuksen aikana.

Mediaani tappava pitoisuus (LC_{50}): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa testin aikana.

Semistaattinen ajoittaisvaihtotesti: Testi, jossa testiliuokset vaihdetaan säännöllisesti määritellyin välein (esimerkiksi 24 tunnin välein).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Somiitti: Somiitit ovat kehittyvissä selkärankaisten alkioissa hermostoputken molemmin puolin olevia mesodermirykelmiä, joista kehittyy verinahka (dermatomi), luustolihakset (myotoomi) ja selkäranka (sklerotomi).

Staattinen testi: Testi, jossa testiliuokset pysyvät muuttumattomina testin ajan.

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aineet: koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit (Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials)

Ylläpitovesi: Vesi, jossa täysikasvuisia kaloja pidetään.

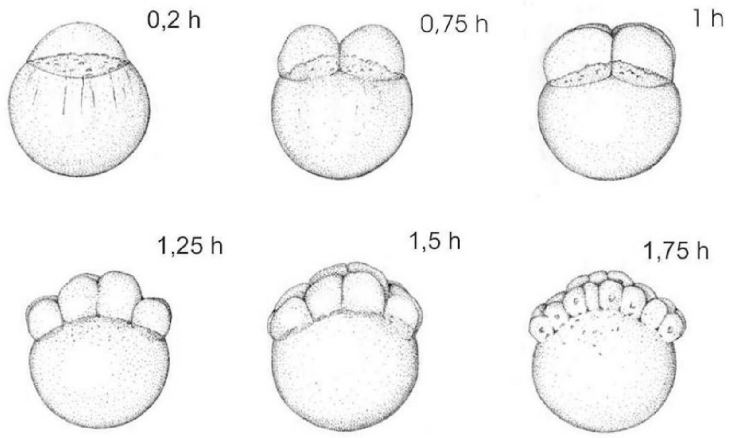
Lisäys 2

YLLÄPITO, KASVATUS JA TYYPILLISET OLOSUHTEET SEEPRAKALAN ALKIOILLA TEHTÄVÄÄ AKUUTTIA TOKSISUUSTESTIÄ VARTEN

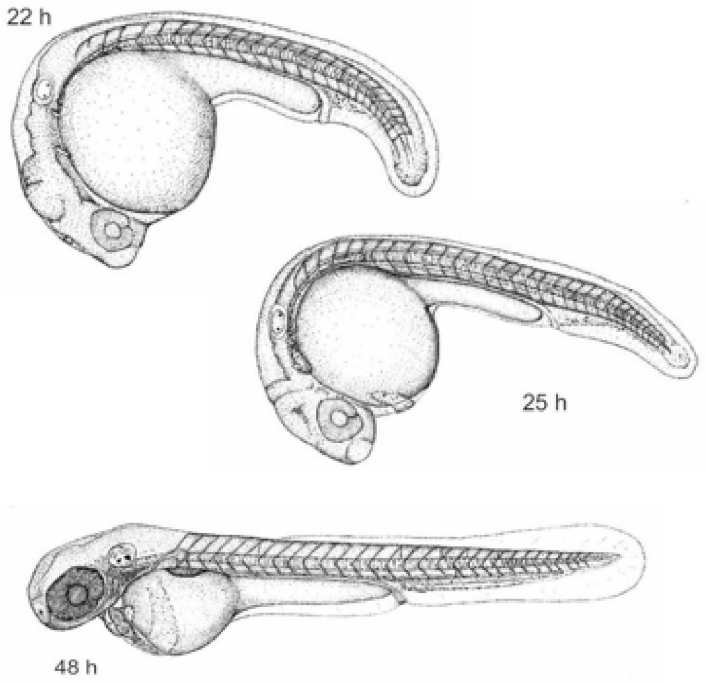
Seeprakala (*Danio rerio*)		
Lajin alkuperä		India, Burma, Malakka, Sumatra
Naaraiden ja koiraiden erilaisuus		Naaraat: esiin työntyvä vatsa mätiä kantavina Koiraat: hoikempia, oranssi vivahde sinisten pituussuuntaisten raitojen välissä (erityisen näkyvä peräevän lähellä)
Ruokinta		Kuivaa hiutaleruokaa (enintään 3 prosenttia kalan painosta päivässä) 3–5 kertaa päivässä; lisäksi suolalehtijalkaisen (*Artemia*-suku) *nauplius*-toukkia ja/tai kontaminoitumattomasta lähteestä saatuja sopivan kokoisia pieniä vesikirppuja. Elävä ravinto lisää ympäristön virikkeellisyyttä, joten sitä olisi käytettävä lisäksi aina, kun se on mahdollista. Veden optimaalisen laadun varmistamiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on poistettava noin tunnin kuluttua ruokinnasta.
Täysikasvuisen kalan arvioitu paino		Naaraat: 0,65 ± 0,13 g Koiraat: 0,5 ± 0,1 g
Emokalojen ylläpito	Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen); 10–20 µE/m²/s, 540–1 080 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot); valojakso 12–16 tuntia
	Veden lämpötila	26 ± 1 °C
	Veden laatu	O_2 ≥ 80 prosentin kyllästymispitoisuus, kovuus: esim. ~ 30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48mg/l, NH_4^+ ja NO_2^-: < 0,001 mg/l, jäännöskloori < 10 µg/l, orgaanisen kloorin kokonaismäärä < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5
	Muita veden laatua koskevia kriteereitä	hiukkaset < 20 mg/l, orgaanisen hiilen kokonaismäärä < 2 mg/l, orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä < 50 ng/l, orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä < 50 ng/l
	Ylläpitotankin koko	esim. 180 l, 1 kala/l
	Vedenpuhdistus	Jatkuva (hiilisuodatus); muita mahdollisuuksia ovat semistaattisen vedenvaihdon tai jatkuvasti vettä vaihtavan läpivirtausjärjestelmän yhdistelmät.
	Koiraiden ja naaraiden suositeltu suhde kasvatusta varten	2:1 (tai massakutu)
Kututankit		Esim. 4 litran kokoiset tankit, joissa on teräsverkkopohja ja keinokasvi kudun stimuloijana; ulkoiset lämpömatot, tai massakutu ylläpitotankeissa
Mätimunien rakenne ja ulkonäkö		Vakaa korion (eli hyvin läpinäkyvä, tarttumaton, halkaisija ~ 0,8–1,5 mm)
Kutumäärä		Yksi täysikasvuinen naaras laskee vähintään 50–80 munaa päivässä. Kutumäärät voivat olla kannasta riippuen huomattavasti suurempia. Hedelmöitymisasteen on oltava ≥ 70 prosenttia. Ensi kertaa kutevilla kaloilla munien hedelmöitymisaste saattaa olla pienempi muutamalla ensimmäisellä kutukerralla.
Testityyppi		Staattinen, semistaattinen, läpivirtaus, 26 ± 1 °C, 24 tunnin ajan esikäsitellyt testauskammiot (esim. 24-kuoppalevyt, 2,5–5 ml kuoppaa kohti)

Lisäys 3

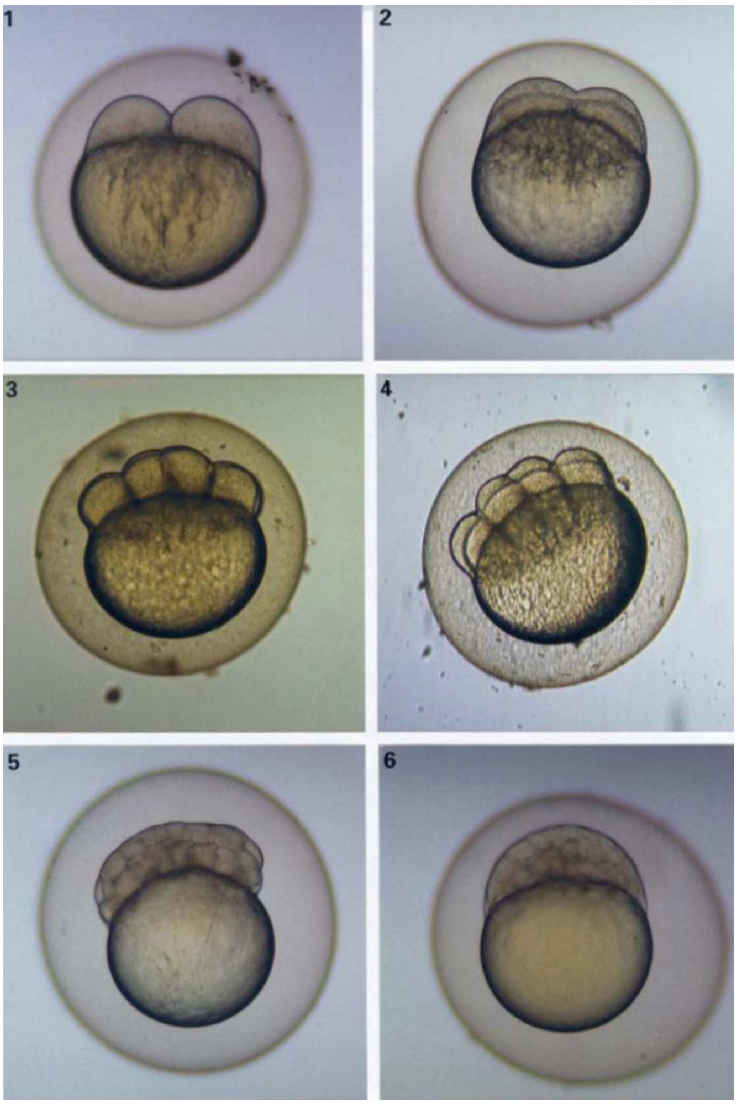
SEEPRAKALAN NORMAALI KEHITYS 26 °C:N LÄMPÖTILASSA



Kuva 1: Seeprakalan (Danio rerio) varhaisen kehityksen tiettyjä vaiheita: 0,2–1,75 tuntia hedelmöitymisen jälkeen (lähde: Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Normaalin kehityksen aikajärjestystä voidaan käyttää sekä munien hedelmöitymisen että niiden elinkyvyn diagnosointiin (ks. 26 kohta: Hedelmöityneiden munien valinta).



Kuva 2: Tiettyjä seeprakalan (Danio rerio) kehityksen vaiheita (alkiosta on poistettu korion näkyvyyden parantamiseksi) 22–48 tuntia hedelmöitymisen jälkeen (lähde: Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

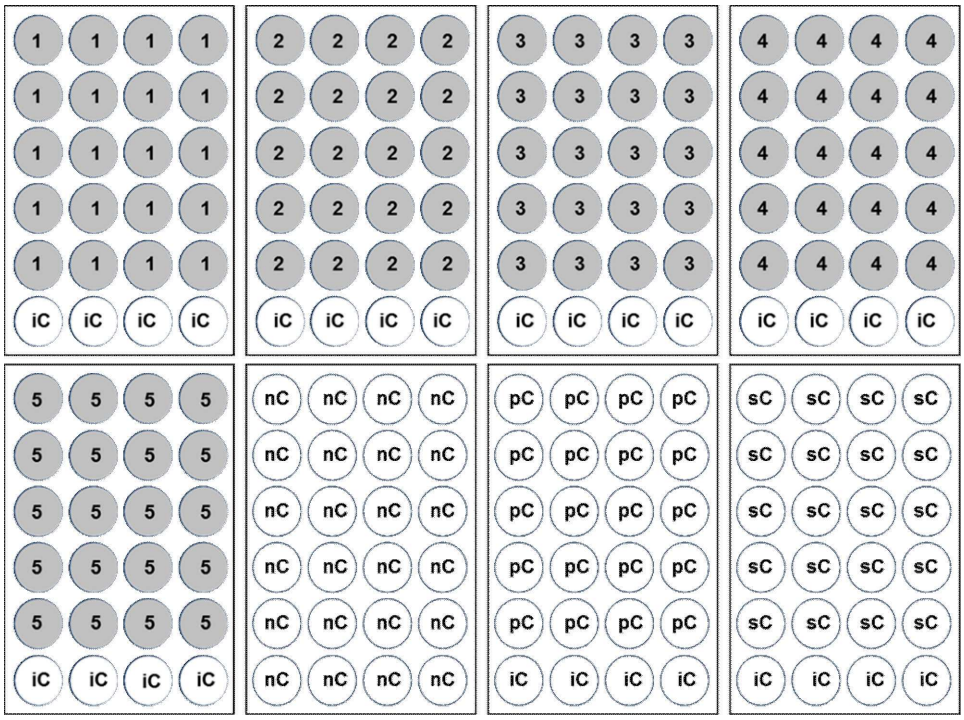


Kuva 3: Seeprakalan (Danio rerio) alkioiden normaali kehitys: (1) 0,75 tuntia, 2-soluinen alkio; (2) 1 tunti, 4-soluinen alkio; (3) 1,2 tuntia, 8-soluinen alkio; (4) 1,5 tuntia, 16-soluinen alkio; (5) 4,7 tuntia, alkava epibolia; (6) 5,3 tuntia, noin 50-prosenttinen epibolia (lähde: Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Lisäys 4

Kuva 1

24-kuoppalevyjen täyttö



1–5 = viisi testipitoisuutta / kemikaali;

nC = negatiivinen kontrolli (laimennusvesi);

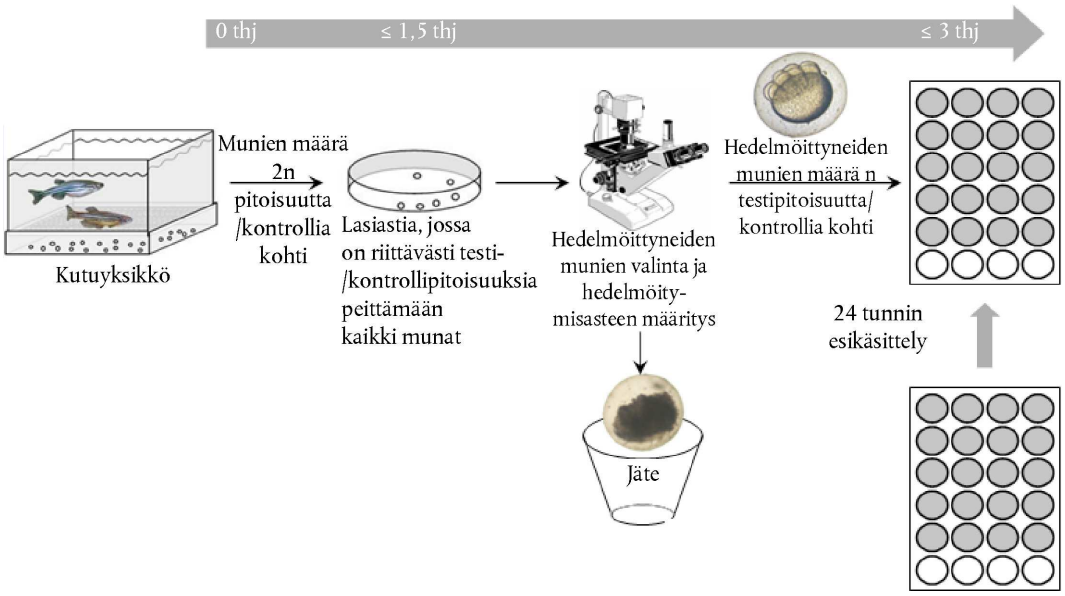
iC = levyn sisäinen kontrolli (laimennusvesi);

pC = positiivinen kontrolli (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = liuotinkontrolli

Kuva 2

Kaavio seeprakalan alkioilla tehtävän akuuttia toksisuutta koskeva testimenettely (vasemmalta oikealle): munien tuotanto, munien kerääminen, esialtistus välittömästi hedelmöitymisen jälkeen lasiastioissa, hedelmöityneiden munien valinta käänteismikroskoopilla tai kaksiokulaarisella mikroskoopilla ja niiden jakaminen 24-kuoppalevyihin, joissa on kutakin testipitoisuutta/kontrolliliuosta, n = testipitoisuutta/kontrolliliuosta kohti tarvittavien munien määrä (tässä 20), thj = tuntia hedelmöitymisen jälkeen.



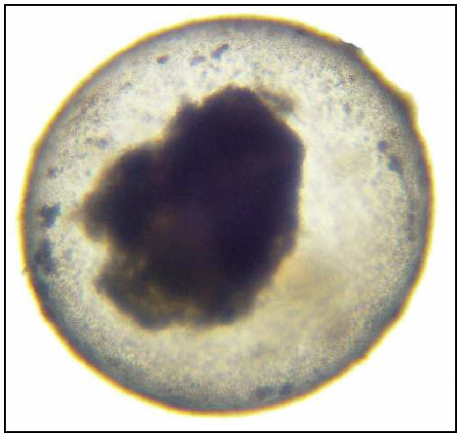
Lisäys 5

KUVASTO SEEPRAKALAN ALKIOILLA TEHTÄVÄN AKUUTIN TOKSISUUSTESTIN LETAALEISTA PÄÄTEPISTEISTÄ

Seuraavat apikaaliset päätepisteet ovat osoitus akuutista toksisuudesta ja siten alkioiden kuolemasta: *alkion koaguloituminen, hännän irtoamattomuus, somiittien muodostumattomuus ja sydämenlyöntien puute*. Seuraavat mikroskooppikuvat on valittu havainnollistamaan näitä päätepisteitä.

Kuva 1

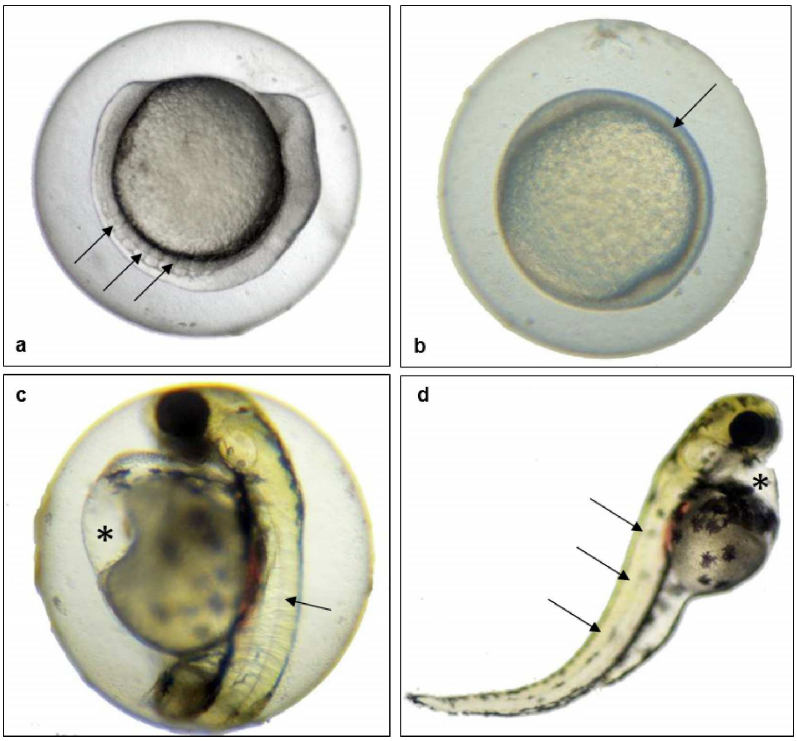
Alkion koaguloituminen:



Helotaustavalaistuksessa koaguloituneissa seeprakalan alkioissa näkyy erilaisia läpinäkymättömiä osia.

Kuva 2

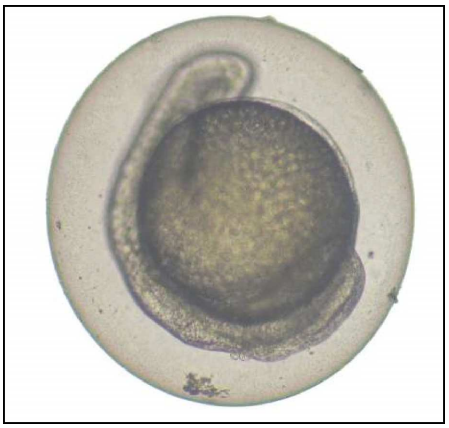
Somiittien muodostumattomuus:



Vaikka 24 tuntia vanhan seeprakalan alkion kehitys on myöhässä noin 10 tuntia, siinä näkyy kuvassa (a) hyvin kehittyneitä somiitteja (→), kun taas kuvan (b) alkiossa ei näy mitään merkkejä somiittien muodostumisesta (→). Vaikka kuvan (c) 48 tuntia vanha seeprakalan alkiolla on selvä ruskuaispussin ödeema, siinä näkyy selvää somiittien muodostumista (→), kun taas kuvassa (d) 96 tuntia vanhassa seeprakalan alkiossa ei näy mitään merkkejä somiittien muodostumisesta (→). Huomaa myös kuvassa (d) olevan alkion selkärangan kieroutuma (skolioosi) sekä perikardiaalinen ödeema (*).

Kuva 3

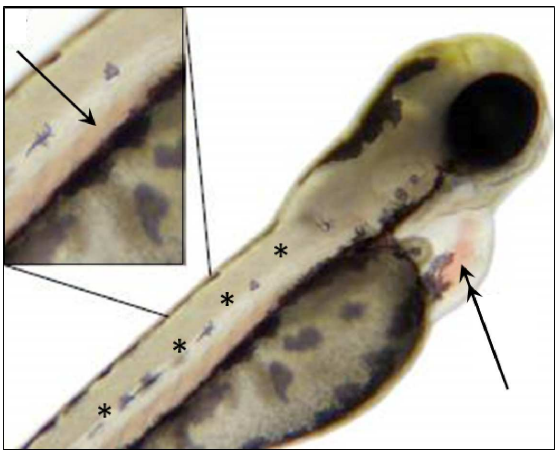
Häntäsilmun irtoamattomuus sivulta nähtynä



(a: →; 96 tuntia vanha seeprakalan alkio). Huomaa myös näkörakkulan puuttuminen (*).

Kuva 4

Sydämenlyöntien puutetta



Sydämenlyöntien puutetta on luonnollisesti vaikea kuvata mikroskooppikuvassa. Sydämenlyöntien puutetta osoittaa se, että sydän ei supistu (kaksoisnuoli). Verisolujen liikkumattomuus esimerkiksi vatsa-aortassa (→ pienemmässä kuvassa) ei ole osoitus sydämenlyöntien puutteesta. Huomaa myös somiittien muodostumattomuus tässä alkiossa (*, lihaskudosten homogeeninen eikä segmentaalinen ulkonäkö). Sydämenlyöntien puutteen kirjaamiseksi vaadittava havainnointiaika on vähintään yksi minuutti vähintään 80-kertaisella suurennuksella.

C.50 **Sedimentitön *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 238 (2014). Sillä arvioidaan kemikaalien toksisuutta *Myriophyllum spicatum* -lajille (tähkä-ärviä), joka on ärviöihin kuuluva kaksisirkkainen uposvesikasvi. Menetelmä perustuu olemassa olevaan ASTM-testimenetelmään (1), joka on muutettu sedimentittömäksi testijärjestelmäksi (2) testikemikaalien todellisen ekotoksisuuden (joka ei riipu testikemikaalin jakautumisesta veden ja sedimentin välillä) arvioimiseksi. Sedimentittömässä testijärjestelmässä analysointi on yksinkertaista (vain vesifaasissa), ja tuloksia voidaan analysoida rinnakkain ja/tai vertaillen limaskoilla (*Lemna sp.*) tehdystä testistä (3) saatujen tulosten kanssa; lisäksi vaadittavien steriilien olosuhteiden avulla mikro-organismien ja levien vaikutukset (muun muassa kemikaalin kulutus/hajoaminen) voidaan pitää mahdollisimman vähäisinä. Tämä testi ei korvaa muita vesieliötoksisuutta koskevia testejä; sen tarkoituksena on pikemminkin täydentää niitä ja mahdollistaa kattavampi vesikasveille aiheutuvan vaaran ja riskin arviointi. Tämä testimenetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella (ring test) (4).

2. Testimenetelmässä kuvataan yksityiskohtaisesti testausta, jossa testiliuos vaihtuu (semistaattinen) tai ei vaihdu (staattinen menetelmä). Testin tavoitteista ja sääntelyvaatimuksista riippuen on suositeltavaa harkita semistaattisen menetelmän käyttöä muun muassa sellaisten aineiden testauksessa, jotka häviävät nopeasti liuoksesta haihtumisen, adsorboitumisen, valohajoamisen, hydrolyysin, saostumisen tai biohajoavuuden vuoksi. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (5). Tätä testimenetelmää sovelletaan aineisiin, joita varten testimenetelmä on validoitu (ks. lähemmin kansainvälisen yhteistutkimuksen raportti (4)) tai valmisteisiin tai tunnettuihin seoksiin; seosta testattaessa sen ainesosat on mahdollisimman pitkälti tunnistettava ja määritettävä kvantitatiivisesti. Sedimentitön *Myriophyllum spicatum* -testimenetelmä täydentää vesisedimenttijärjestelmässä tehtävää *Myriophyllum spicatum* -toksisuustestiä (6). Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen sääntelytarkoituksiin, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

3. Jatkuvasti kasvavien *Myriophyllum spicatum* -lajin kasviviljelmien (vain Andrewsin elatusaineen muunnoksessa, ks. lisäys 2) 14 päivän ajan monokulttuureina testiaineen eri pitoisuuksissa sedimentittömässä testijärjestelmässä. Testin tavoitteena on kvantifioida testikemikaaliin liittyvät vaikutukset kasvien kasvuun tämän ajan kuluessa tiettyjen mittausmuuttujien arvioinnin perusteella. Versojen, sivuhaarojen ja juurien pituuden kasvu sekä tuore- ja kuivapainon kehitys ja kiehkuroiden lisääntyminen ovat mittausmuuttujia. Lisäksi huomioon otetaan koe-eliöiden selvästi erottuvat kvalitatiiviset muutokset, kuten epämuotoisuus tai kloroosi ja nekroosi, joka ilmenee kellastumisena tai valkoisena ja ruskeana värinä. Testikemikaaliin liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrolleissa tapahtuneeseen kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran. Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona, esimerkiksi EC_{10}, EC_{20} tai EC_{50}. On syytä huomata, että EC_{10}- ja EC_{20}-arvojen arviot ovat luotettavia ja asianmukaisia vain testeissä, joissa kontrollikasvien variaatiokertoimet ovat pienemmät kuin arvioitava vaikutustaso. Toisin sanoen vaikutuskertoimien on oltava < 20 prosenttia, jotta EC_{20}-arvo voidaan arvioida luotettavasti.

4. Käsittelemättömistä ja käsitellyistä kasveista on määritettävä sekä keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (joka arvioidaan pääverson pituuden ja kolmen muun mittausmuuttujan määrittämisen perusteella) että tuotos (joka arvioidaan pääverson pituuden sekä kolmen muun mittausmuuttujan lisääntymisen perusteella). Spesifistä kasvunopeutta (r) ja tuotosta (y) käytetään tämän jälkeen E_rC_x-arvon (esimerkiksi E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x-arvon (esimerkiksi E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määrittämiseen.

5. Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

6. Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testikemikaali voidaan kvantifioida riittävän herkästi. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus ja epäpuhtaudet, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, hapon dissosiaatiovakio (pK_a), jakaantumiskerroin oktanoli/vesi (K_{ow}), höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää merkittävästi testin aikana. Tämän perusteella voidaan päättää, vaativatko tällaiset häviöt erityistoimia. Jos testikemikaalin liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään.

7. Testiviljelyaineen pH:n tarkistaminen on erityisen tärkeää esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja aineita. OECD:n ohjeasiakirjassa (5) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

TESTIN VALIDITEETTI

8. Jotta testi olisi validi, pääverson pituuden on kaksinkertaistuttava kontrolliviljelmässä alle 14 päivässä. Käytettäessä tässä testimenetelmässä kuvattuja testiliuoksia ja -olosuhteita tämä vaatimus voidaan täyttää käyttämällä staattista tai semistaattista testausta.

9. Versojen tuorepainon määrityksiin perustuvan tuoton (testin aloittamisesta testi päättämiseen) sekä muiden mittausmuuttujien (ks. 37 kohta) keskimääräinen variaatiokerroin kontrolliviljelmien välillä ei saa olla yli 35 prosenttia rinnakkaisnäytteiden välillä.

10. Yli 50 prosenttia kontrolliryhmän rinnakkaisnäytteistä pidetään steriileinä koko 14 päivää kestävän altistusajan. Tämä tarkoittaa, että niissä ei ole muita organismeja, kuten leviä, sieniä ja bakteereita, näkyvinä epäpuhtauksina (kirkas liuos). *Huom.* Ohjeita steriiliyden arvioinnista annetaan kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa (4).

VERTAILUKEMIKAALI

11. Vertailukemikaali(t), kuten kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (4) käytetty 3,5-dikloorifenoli, voidaan testata testimenettelyn tarkistamiseksi; kansainvälisen yhteistutkimuksen tietojen mukaan 3,5-dikloorifenolin keskimääräiset EC_{50}-arvot eri vastemuuttujille (ks. tämän testimenetelmän 37–41 kohta) ovat 3,2–6,9 mg/l (tarkempia tietoja näiden arvojen luottamusvälistä on kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa). Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testikemikaalin toksisuutta.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

12. Kaikkien välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Viljelyyn ja testaukseen käytettävien lasiastioiden on oltava steriilejä ja ne on puhdistettava kemiallisista epäpuhtauksista, jotka voivat päästä testiviljelyaineeseen. Koeastioiden on oltava niin korkeita, että eri versot voivat kasvaa kontrolliastioissa vesifaasissa ulottumatta testiviljelyaineen pintaan testin lopussa. Koeastioiksi suositellaan paksuseinäisiä borosilikaattilasista valmistettuja reunuksettomia koeputkia, joiden sisähalkaisija on noin 20 mm ja pituus noin 250 mm ja joissa on alumiinitulpat.

13. Koska muunnettu Andrewsin kasvualusta sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), testiliuokset on valmistettava steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriililla työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

14. Viljelmiä ja koeastioita ei saa säilyttää toistensa kanssa. Sen vuoksi on paras käyttää erillisiä ilmastoituja kasvatuskaappeja, inkubaattoreita tai huoneita. Valaistuksen ja lämpötilan on oltava säädettävissä, ja ne on pidettävä tasaisina.

Koe-eliö

15. *Myriophyllum spicatum* on ärviöiden sukuun kuuluva kaksisirkkainen uposkasvilaji. Kesäkuusta elokuuhun sen vaaleanpunertavat huomaamattomat kukat kurottuvat vedenpinnan yläpuolelle. Kasvit juurtuvat pohjaan lujilla juurakoilla, ja niitä tavataan koko pohjoisella pallonpuoliskolla rehevöityneissä, mutta pilaantumattomissa ja kalkkipitoisissa rauhallisissa mutapohjaisissa vesissä. *Myriophyllum spicatum* viihtyy parhaiten makeassa vedessä, mutta sitä tavataan myös murtovesissä.

16. Sedimentitöntä toksisuustestiä varten tarvitaan steriilejä kasveja. Jos testilaboratoriolla ei ole *Myriophyllum spicatum* -lajin kantaviljelmiä, steriili kasvimateriaali voidaan hankkia toisesta laboratoriosta tai (epästeriili) kasvimateriaali voidaan kerätä luonnosta tai hankkia kaupalliselta toimittajalta; jos kasvit kerätään luonnosta, lajimääritys on todennettava taksonomisesti. Jos kasvit kerätään luonnosta tai hankitaan kaupalliselta toimittajalta, ne on steriloitava (1) ja niitä on viljeltävä testissä käytettävässä viljelyaineessa vähintään kahdeksan viikkoa ennen käyttöä. Paikoissa, joista alkuviljelmien kasvit kerätään, ei saa olla ilmeisiä kontaminaatiolähteitä. Kerättäessä *Myriophyllum spicatum* -kasveja luonnosta on varmistettava huolellisesti, että kerätään oikeaa lajia, erityisesti alueilla, jossa se voi risteytyä muiden *Myriophyllum*-lajien kanssa. Jos kasvit hankitaan toisesta laboratoriosta, niitä on viljeltävä vastaavalla tavalla kolmen viikon ajan. Kasvimateriaalin lähde sekä testauksessa käytettävät lajit on aina ilmoitettava.

17. Testissä käytettävät kasvit on valittava huolellisesti, koska niiden laatu ja yhtenäisyys vaikuttavat merkittävästi testin tulokseen. Testissä on käytettävä nuoria, nopeasti kasvavia kasveja, joissa ei ole näkyviä vaurioita tai värimuutoksia (kloroosia). Koe-eliön valmistelu on kuvattu yksityiskohtaisesti lisäyksessä 4.

Viljely

18. Viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Myriophyllum*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää normaalia heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C). Viljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 3.

19. Riittävä määrä koe-eliöitä siirretään aseptisesti vähintään 14–21 päivää ennen testausta tuoreeseen steriiliin viljelyaineeseen, ja niitä viljellään 14–21 päivän ajan testiolosuhteissa esiviljelmänä. Esiviljelyä on kuvattu yksityiskohtaisesti lisäyksessä 4.

Testiviljelyaine

20. *Myriophyllum spicatum* -lajia varten suositellaan vain yhtä viljelyainetta sedimentittömässä testijärjestelmässä lisäyksen 2 mukaisesti. Andrewsin kasvualustan muunnosta suositellaan *Myriophyllum spicatum* -lajin viljelyyn ja sillä tehtävään testaukseen kirjallisuusviitteen (1) mukaisesti. Muutettu Andrewsin kasvualusta sekoitetaan viidestä erikseen valmistetusta kantaravinneliuoksesta lisäämällä 3 prosenttia sakkaroosia. Esiviljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 2.

21. Kymmenkertaisesti tiivistettyä muutettua Andrewsin kasvualustaa tarvitaan testiliuosten valmistamiseen (tarvittaessa laimentamalla). Tämän viljelyaineen koostumus esitetään lisäyksessä 2.

Testiliuokset

22. Testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla kantaliuosta. Testikemikaalin kantaliuokset valmistetaan tavallisesti liuottamalla kemikaali demineralisoituun (eli tislattuun tai deionisoituun) veteen. Ravinteet lisätään käyttämällä kymmenkertaisesti tiivistettyä muutettua Andrewsin kasvualustaa.

23. Testikemikaalin kantaliuokset voidaan steriloida autoklavoimalla ne 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan tai steriilin suodatuksen avulla edellyttäen, että käytettävä sterilointimenetelmä ei denaturoi testikemikaalia. Testiliuokset voidaan myös valmistaa steriiliin demineralisoituun veteen tai viljelyaineeseen steriileissä olosuhteissa. Lämpövakaus ja adsorboituminen erilaisiin pintoihin on otettava huomioon testikemikaalin kantaliuosten sterilointimenettelyn valinnassa. Tästä syystä suositellaan, että kantaliuokset valmistetaan steriileissä olosuhteissa eli käyttämällä steriiliä materiaalia testikemikaalin liuottamiseen steriileissä olosuhteissa (esimerkiksi liekityssterilointi, laminaarivirtauskuvut) steriiliin veteen. Tämä steriilien kantaliuosten valmistusmenetelmä on validi sekä aineille että seoksille.

24. Testikemikaalin suurin testattu pitoisuus ei yleensä saa ylittää kyseisen kemikaalin vesiliukoisuutta testiolosuhteissa. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä kemikaalista väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testikemikaalimäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testikemikaalin dispersiota ja liukenemista. Tällaisten aineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 µl/l. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 µl/l), ja liuottimeen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä ja kontrolliliuoksissa. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (5).

Testi- ja kontrolliryhmät

25. Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testikemikaalin toksisuudesta *Myriophyllum spicatum* -lajille on saatavilla aiempia tietoja esimerkiksi alustavista pitoisuusalueen määrityskokeista. Lopullisessa toksisuustestissä on yleensä oltava vähintään viidestä (kuten limaskojen kasvunestymistestissä, tämän liitteen C.26 luku) seitsemään testipitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan; ne on valittava siten, että NOEC- ja EC_{50}-arvot ovat kyseisellä pitoisuusalueella (ks. jäljempänä). Testipitoisuuksien suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2, mutta suurempikin suhdeluku sallitaan, jos pitoisuus-vastekäyrä on laakea. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Jokaisesta testipitoisuudesta on tehtävä vähintään kolme toistoa.

26. Valittaessa testin pitoisuusaluetta (pitoisuusalueen määritystä ja/tai lopullista toksisuustestiä varten) on otettava huomioon seuraavat näkökohdat:

EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta.

Jos tavoitteena on arvioida LOEC- tai NOEC-pitoisuus, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei ole merkittävästi vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Muussa tapauksessa testi on toistettava käyttämällä toista pitoisuusaluetta (jollei suurin pitoisuus ole liukoisuusrajalla tai jollei se ole suurin vaadittu rajapitoisuus, esimerkiksi 100 mg/l).

27. Jokaiseen testiin on sisällyttävä kontrolleja, joissa ravinneliuos, koe-eliö (valitaan mahdollisimman homogeeninen kasvimateriaali, tuoreita sivuhaaroja esiviljelmistä, jotka lyhennetään 2,5 cm:n mittaisiksi haaran juuresta mitattuna), ympäristöolosuhteet ja menettelyt ovat samat kuin testiryhmässä mutta ilman testikemikaalia. Jos apuna käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, testiin on kuuluttava ylimääräinen kontrollikäsittely, jossa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuus on sama kuin testikemikaalia sisältävissä astioissa. Toistoissa kontrolliastioiden (ja liuotinta käytettäessä liuotinta sisältävien astioiden) lukumäärän on oltava vähintään kymmenen.

28. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on kuitenkin oltava vähintään kymmenen.

Altistus

29. Tuoreita sivuhaaroja, jotka on lyhennetty 2,5 cm:n mittaisiksi tyvestä mitattuna, siirretään esiviljelmästä ja jaetaan satunnaisesti koeastioihin aseptisissa olosuhteissa. Jokaisessa koeastiassa on oltava yksi 2,5 cm:n pituinen sivuttaishaara, jonka yhdessä päässä on oltava apikaalimeristeemi. Valitun kasvimateriaalin olisi oltava laadultaan samanlaista jokaisessa koeastiassa.

30. Koeastiat on sijoitettava inkubaattoriin satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet. Vaatimuksena on myös, että jokaisella havainnointikerralla käytetään lohkoittaista järjestystä tai astioiden satunnaistettua uudelleensijoittelua (joka voidaan tehdä useamminkin)

31. Jos alustava stabiiliustesti osoittaa, että testikemikaalin pitoisuutta ei voida pitää yllä testin ajan eli 14 päivää (toisin sanoen mitattu pitoisuus vähenee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta), on suositeltavaa käyttää semistaattista testijärjestelmää. Siinä tapauksessa kasvit on altistettava vastavalmistetuille testi- ja kontrolliliuoksille ainakin kerran testin aikana (esimerkiksi päivänä 7). Testikemikaalin stabiiliudesta riippuu, kuinka usein koloniat on altistettava vastavalmistetulle viljelyaineelle. Testattaessa hyvin epästabiileja tai haihtuvia kemikaaleja pitoisuuksien pitäminen lähes vakioina voi vaatia useampia altistuskertoja.

32. Tähän testimenetelmään ei kuulu versojen altistaminen ruiskuttamalla.

Testiolosuhteet

33. Testissä käytetään lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon säteilyvoimakkuudeksi saadaan 100–150 µE m^{-2} s^{-1}, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) pisteissä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin koeastioiden pohjat (tämä vastaa voimakkuusaluetta 6 000–9 000 luksia), ja valoisien ja pimeiden jaksojen kestot ovat 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää.Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

34. Lämpötilan on oltava koeastioissa 23 ± 2 °C. Erityistapauksissa, esimerkiksi testattaessa epästabiileja kemikaaleja tai metalleja, on kiinnitettävä erityistä huomiota pH:n vaihteluun; pH-arvon on pysyttävä välillä 6–9. Tästä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (5).

Kesto

35. Testi päättyy 14 päivän kuluttua kasvien siirtämisestä koeastioihin.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

36. Testin alussa koe-eliön pääverson pituus on 2,5 cm (ks. 29 kohta); se mitataan mittaviivaimella (ks. lisäys 4) tai valokuvaamalla ja kuva-analyysillä. Normaaleilta tai epänormaaleilta vaikuttavien koe-eliöiden pääverson pituus määritetään testinalussa, ainakin kerran 14 päivää kestävän altistusjakson aikana ja testin päättyessä. Huomautus: Jos kuva-analyysiä ei ole käytettävissä, pääverson pituuden mittaamiseen testin alussa ja sen aikana voidaan vaihtoehtoisesti käyttää myös steriiliä mittaviivainta edellyttäen, että työpöytä steriloidaan ennen kasvien laittamista koeastioihin. Kasvien kehityksessä tapahtuvat muutokset, esimerkiksi versojen epämuodostumat, merkit nekroosista tai kloroosista, hajoaminen tai kelluvuuden heikkeneminen sekä muutokset juurien pituudessa ja ulkonäössä, rekisteröidään. Lisäksi on rekisteröitävä testiviljelyaineen erityiset ominaisuudet (esimerkiksi liukenemattoman materiaalin esiintyminen ja levien, sienien ja bakteerien kasvu koeastiassa).

37. Pääverson pituuden määrittämisen lisäksi testin aikana arvioidaan myös testikemikaalin vaikutuksia kolmeen (tai useampaan) seuraavista mittausmuuttujista:

i. Sivuhaarojen kokonaispituus

ii. Versojen kokonaispituus

iii. Juurien kokonaispituus

iv. Tuorepaino

v. Kuivapaino

vi. Kiehkuroiden määrä

Huomautus 1: Alueenmäärityskokeen aikana tehdyt havainnot voivat auttaa valitsemaan merkitykselliset muut mitattavat muuttujat edellä luetelluista kuudesta muuttujasta.

Huomautus 2: Tuore- ja kuivapainon (muuttujat iv ja v) määrittäminen on erittäin suositeltavaa.

Huomautus 3: Koska sakkaroosi ja valo (juurien altistaminen valolle testin aikana) voi vaikuttaa auksiinin (kasvien kasvuhormoni) kuljettajiin ja eräiden kemikaalien vaikutustapa saattaa muistuttaa auksiinia, juuria koskevan päätepisteen (muuttuja iii) mukaan ottaminen on kyseenalaista.

Huomautus 4: Kansainvälisen yhteistutkimuksen tulokset osoittavat, että sivuhaarojen kokonaispituuden (muuttuja i) variaatiokertoimet ovat suuria (> 60 prosenttia). Sivuhaarojen kokonaispituus sisältyy joka tapauksessa versojen kokonaispituuden (muuttuja ii) mittaamiseen, jonka variaatiokertoimet ovat hyväksyttävämmällä tasolla (< 30 prosenttia).

Huomautus 5: Edellä esitettyjen näkökohtien perusteella suositellut tärkeimmät mitattavat päätepisteet ovat: versojen kokonaispituus, tuorepaino ja kuivapaino (muuttujat ii, iv ja v); muuttuja vi – kiehkuroiden määrä – jätetään kokeen suorittajan harkinnan varaan.

38. Pääverson pituudella ja kiehkuroiden määrällä on se etu, että ne voidaan määrittää jokaisen testi- ja kontrolliastian osalta testin alussa, sen aikana ja sen lopussa valokuvien ja kuva-analyysin avulla, joskin myös (steriiliä) mittaviivainta voidaan käyttää.

39. Sivuhaarojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus (kaikkien sivuhaarojen tai juurien summa) ja versojen kokonaispituus (pääverson pituuden ja sivuhaarojen kokonaispituuden summa) voidaan mitata mittaviivaimella altistuksen lopussa.

40. Tuore- ja/tai kuivapaino on määritettävä testin alussa esiviljelmästä otetusta näytteestä, jonka on oltava edustava näyte testin käynnistämiseen käytetystä materiaalista, sekä testin lopussa jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta otetusta kasvimateriaalista.

41. Sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä voidaan määrittää seuraavasti:

i. Sivuhaarojen kokonaispituus: Sivuhaarojen kokonaispituus voidaan määrittää mittaamalla kaikki sivuhaarat mittaviivaimella altistuksen lopussa. Sivuhaarojen kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian kaikkien sivuhaarojen summa.

ii. Versojen kokonaispituus: Pääverson pituus voidaan määrittää kuva-analyysillä tai mittaviivaimella. Versojen kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian pääverson pituuden ja sivuhaarojen kokonaispituuden summa altistuksen lopussa.

iii. Juurien kokonaispituus: Juurien pituus voidaan määrittää mittaamalla kaikki sivuhaarat mittaviivaimella altistuksen lopussa. Juurien kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian kaikkien juurien summa.

iv. Tuorepaino: Tuorepaino voidaan määrittää punnitsemalla koe-eliöt altistuksen lopussa. Jokaisessa testi- ja kontrolliastiassa oleva kaikki kasvimateriaali huuhdotaan tislatulla vedellä ja imeytetään kuivaksi selluloosapaperiin. Tämän valmistelun jälkeen tuorepaino määritetään punnitsemalla. Testin alussa oleva biomassa (tuorepaino) määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen.

v. Kuivapaino: Tuorepainon määrittämiseksi tehtyjen valmistelujen jälkeen koe-eliöt kuivataan 60 °C:n lämpötilassa, kunnes niiden paino on vakio. Tämä massa on kuivapaino. Testin alussa oleva biomassa (kuivapaino) määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen.

vi. Kiehkuroiden määrä: Kaikki pääversosta kasvavat kiehkurat lasketaan.

Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys

42. Käytettäessä staattista testimenetelmää kunkin käsittelyn liuoksen pH on mitattava testin alussa ja lopussa. Jos testimenetelmä on semistaattinen, pH on mitattava jokaisesta erästä ”tuoretta” testiliuosta ennen kutakin vaihtoa ja myös vastaavista ”käytetyistä” liuoksista.

43. Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin koe-eliöistä. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin aikana. Viljelyaineen lämpötila surrogaattiastiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä (tai jatkuvasti tiedonkeruulaitteen avulla).

44. Testikemikaali(e)n pitoisuudet määritetään testin aikana sopivin väliajoin. Staattisissa testeissä vähimmäisvaatimuksena on määrittää pitoisuudet testin alussa ja lopussa.

45. Semistaattisissa testeissä, joissa testikemikaali(e)n pitoisuuksien ei oleteta pysyvän ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, on analysoitava kaikki vastavalmistetut testiliuokset ja samat liuokset käytettyinä kunkin vaihdon yhteydessä. Kuitenkin niissä testeissä, joissa testikemikaali(e)n mitatut alkupitoisuudet eivät ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Kaikissa tapauksissa on testipitoisuudet ennen vaihtoa määritettävä vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

46. Jos on näyttöä siitä, että testipitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä (5).

Raja-annostesti

47. Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testikemikaalilla ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testikemikaalilla on testiviljelyaineessa, tai jos kyseessä on formulaatti, sen dispergoituvuusrajaan asti, voidaan tehdä raja-annostesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus raja-annostestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös raja-annostestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, joka on kaksinkertaistettava. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Vastemuuttujat

48. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset *Myriophyllum spicatum* -lajin kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä seuraavien kahden muuttujan avulla: pääverson pituuden logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän) logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos. *Huom.* Sivuhaarojen kokonaispituutta ja juurien kokonaispituutta koskevien mittausmuuttujien osalta keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden laskeminen ei ole mahdollista. Testin alussa koe-eliöllä ei ole sivuhaaroja eikä juuria (esiviljelmän valmistelun vuoksi); koska alkuarvona on nolla, keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden laskentaa ei ole määritetty.

b) Tuotos: Tämä vastemuuttuja lasketaan seuraavien kahden muuttujan avulla: pääverson pituuden muutokset ja jonkin toisen mittausmuuttujan – mieluiten versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän tai muiden hyödyllisiksi katsottujen muuttujien – muutokset kontrolleissa ja kussakin käsitellyssä ryhmässä testin loppuun saakka.

49. Toksisuuden arviointien on perustuttava pääverson pituuteen ja kolmeen muuhun mittausmuuttujaan (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä, ks. 37 kohta ja tämän kohdan huomautukset 2, 4 ja 5), koska eräät kemikaalit voivat vaikuttaa enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin pääverson pituuteen. Tätä vaikutusta ei havaittaisi laskemalla pelkästään pääverson pituus.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

50. Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan kasvumuuttujien – pääverson pituuden ja kolmen muun mittausmuuttujan (esimerkiksi versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän) – logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kaikkiin kontrolliliuosten ja käsiteltyjen liuosten toistoihin:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

jossa

μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

t = aikaväli i–j.

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

51. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki ”i” tarkoittaa testin alkua ja hetki ”j” testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Sen lisäksi on määritettävä jaksoittaiset kasvunopeudet, jotta voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia koko altistusaikana (esimerkiksi analysoimalla logaritmisia kasvukäyriä).

52. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

jossa

% Ir = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μC = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

μT = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

Tuotos

53. Tuotokseen kohdistuvat vaikutukset määritetään seuraavien mittausmuuttujien avulla: pääverson pituus ja kolme muuta mittausmuuttujaa (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä), jotka mitataan jokaisesta koeastiasta testin alussa ja lopussa. Jos toisena mittausmuuttujana käytetään tuorepainoa tai kuivapainoa, testin alussa oleva biomassa määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen. Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

jossa

% Iy = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

bC = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

bT = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

Kaksinkertaistumisaika

54. Seuraavan kaavan avulla, jota sovelletaan kontrolliastioita koskeviin tietoihin, voidaan määrittää pääverson pituuden kaksinkertaistumisaika (T_d) ja varmistaa samalla, että testi täyttää tämän validiteettivaatimuksen (ks. 8 kohta):

$T_d = \ln 2 / \mu$

Kaavassa μ on keskimääräinen spesifinen kasvunopeus, joka lasketaan 50–52 kohdassa kuvatulla tavalla.

Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen

55. Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan 53 kohdan mukaan) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

EC_x-pitoisuuden arviointi

56. EC_x-pitoisuuden estimaattien on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x). Näistä kummankin on puolestaan perustuttava pääverson pituuteen ja mahdollisesti johonkin toiseen mittausmuuttujaan (mieluiten versojen kokonaispituuteen, tuorepainoon, kuivapainoon tai kiehkuroiden määrään), koska eräät kemikaalit vaikuttavat eri tavalla pääverson pituuteen kuin muihin mittausmuuttujiin. Tavoitteena on siis saada toksisuusparametreiksi seuraavat neljä EC_x-arvoa kutakin laskettua kasvunestymistasoa x kohden: E_rC_x (pääverson pituus); E_rC_x (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä); E_yC_x (pääverson pituus); ja E_yC_x (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä).

57. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut EC_x-arvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat useimmiten suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen.

Tilastomenetelmät

58. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-malleilla (7) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (7). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (8), (9) ja (10) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

59. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

60. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (10), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

61. LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Sen jälkeen kunkin pitoisuuden keskiarvoa verrataan kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (12) (13) (14) (15) (16). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (15). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (10) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

62. Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä *Myriophyllum*-testiä varten. Sopivalta kuitenkin vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

Raportointi

63. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testilajit

— tieteellinen nimi ja alkuperä.

Testiolosuhteet

— käytetty testimenettely (staattinen tai puolistaattinen)

— testin alkamispäivä ja kesto

— testiviljelyaine

— koejärjestely: koeastiat ja niiden sulkimet, liuostilavuudet, pääverson pituus koeastiaa kohden testin alussa

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä

— lämpötila testin aikana

— valolähde, valon voimakkuus ja homogeenisuus

— testi- ja kontrolliviljelyaineen pH-arvot

— testikemikaalin analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit)

— pääverson pituuden ja muiden mittausmuuttujien, esimerkiksi sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän määrittämismenetelmät

— kunkin testi- ja kontrolliastian viljelmän tila (steriili vai epästeriili) kullakin havainnointikerralla

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä,

Tulokset

— käsittelemättömät tiedot: pääverson pituus ja muut mittausmuuttujat jokaisessa testaukseen ja toistoihin käytetyssä koeastiassa kullakin havainnointi- ja analysointikerralla

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat

— kunkin mittausmuuttujan kasvukäyrät

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys

— toksisuusarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus)

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä liuoksissa

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ASTM Designation E 1913–04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, s. 702–710.

(2) Tämän liitteen luku C.26: *Limaskojen (Lemna-lajien)* kasvunestymistesti.

(3) OECD (2014), "*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(5) Tässä liitteessä oleva C.51 luku: *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti vesisedimenttijärjestelmässä

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, s. 713–718.

(7) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, s. 157–167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, s. 1485–1494.

(9) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, s. 1096–1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, s. 482–491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, s. 103–117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, s. 519–531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, s. 93–96.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin tuore- ja/tai kuivapaino. Tässä testissä biomassa on pääverson, kaikkien sivuhaarojen ja kaikkien juurien summa.

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa *Myriophyllum spicatum* -kasvin kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia "E_rC" ja jälkimmäisestä symbolia "E_yC", joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (pääverson pituus).

Kasvu: mittausmuuttujan, kuten pääverson pituuden, sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): mitattavan muuttujan logaritminen kasvu altistuksen aikana. *Huom.* Kasvunopeuteen liittyvät vastemuuttujat ovat riippumattomia testin kestosta, jos altistamattomien kontrollieliöiden kasvu on eksponentiaalista.

Kemikaali: aine tai seos.

Kloroosi: koe-eliön, erityisesti kiehkuroiden, värin muutos vihreästä kellertäväksi.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä testimenetelmässä mittausmuuttujia ovat pääverson pituus, sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä.

Monokulttuuri: yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi on testieliön kuollutta (eli valkoista tai tummanruskeaa) kudosta.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

Testikemikaali on mikä tahansa tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Testin päätepiste kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä testimenetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo. Huomautus: Kun altistamattomien eliöiden kasvu on eksponentiaalista, tuotokseen perustuvat vastemuuttujat vähenevät testin keston pidentyessä.

UVCB-aine: koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan toksisuutta. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeus ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten pääverson pituudesta, versojen kokonaispituudesta, tuorepainosta, kuivapainosta tai kiehkuroiden määrästä.

Lisäys 2

MUUTETTU ANDREWSIN KASVUALUSTA KANTAVILJELMÄÄ JA ESIVILJELMÄÄ VARTEN

Kantaviljelmää ja esiviljelmää varten tarvittava muutettu Andrewsin kasvualusta valmistetaan viidestä erikseen valmistetusta kantaliuoksesta ja siihen lisätään 3 prosenttia sakkaroosia.

Taulukko 1

Andrewsin ravinneliuoksen koostumus: (ASTM Designation E 1913-04)

Kantaravinneliuoksen valmistus			Ravinneliuoksen valmistus
Kantaliuos	Kemikaali	Alkupaino / 1 000 ml	ml / 5 l ravinneliuosta
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Ks. jäljempänä kantaliuos nro 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0 278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0 372 g	

Kantaliuoksia voidaan säilyttää jääkaapissa 6 kuukautta (5–10 °C lämpötilassa) Vain kantaliuoksella nro 5 on lyhyempi säilyvyysaika (kaksi kuukautta).

Taulukko 2

Kantaliuoksen nro 3.1 valmistus kantaliuoksen nro 3 valmistusta varten

Kemikaali	Alkupaino g / 100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Kantaliuoksen nro 3.1 valmistamisen jälkeen (taulukko 2) tämä liuos pakastetaan noin 11 ml:n määräosissa (vähintään – 18 °C:n lämpötilassa). Pakastettujen annosten säilyvyysaika on viisi vuotta.

Kantaliuoksen nro 3 valmistamiseksi sulatetaan kantaliuos nro 3.1, kaadetaan 10 ml sitä 1 litran vetoiseen mittapulloon ja lisätään ultrapuhdasta vettä pullon mittamerkkiin asti.

Muutetun Andrewsin kasvualustan valmistamiseksi 5 litran mittapulloon kaadetaan noin 2 500 ml ultrapuhdasta vettä. Kun siihen on lisätty 50 ml kutakin kantaliuosta, mittapullo täytetään 90 prosenttiin asti ultrapuhtaalla vedellä ja pH-arvoksi säädetään 5,8.

Tämän jälkeen lisätään 150 g liuotettua sakkaroosia (3 prosenttia 5 litraa kohti) ja täytetään mittapullo ultrapuhtaalla vedellä mittamerkkiin asti. Lopuksi ravinneliuos kaadetaan 1 litran Schott-pulloihin ja autoklavoidaan 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan.

Näin saatu ravinneliuos voidaan säilyttää steriilinä jääkaapissa (5–10 °C:n lämpötilassa) kolme kuukautta.

Muutettu Andrewsin kasvualusta sedimentitöntä toksisuustestiä varten

Taulukoissa 1 ja 2 mainituista viidestä kantaravinneliuoksesta valmistetaan testiliuosten valmistamiseen tarvittava kymmenkertaisesti tiivistetty muutettu Andrewsin viljelyneste, johon lisätään 30 prosenttia sakkaroosia. Tätä varten kaadetaan noin 100 ml ultrapuhdasta vettä 1 litran mittapulloon. Siihen lisätään 100 ml kutakin kantaliuosta ja pH-arvoksi säädetään 5,8. Tämän jälkeen lisätään 30 prosenttia liuotettua sakkaroosia (300 g / 1 000 ml) ja mittapullo täytetään ultrapuhtaalla vedellä mittamerkkiin asti.

Lopuksi ravinneliuos kaadetaan 0,5 litran Schott-pulloihin ja autoklavoidaan 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan.

Näin saatu kymmenkertaisesti tiivistetty muutettu ravinneliuos voidaan säilyttää steriilinä jääkaapissa (5–10 °C:n lämpötilassa) kolme kuukautta.

Lisäys 3

KANTAVILJELMÄN YLLÄPITO

Tässä lisäyksessä kuvaillaan ärviöiden sukuun kuuluvan kaksisirkkaisen *Myriophyllum spicatum* L -uposkasvilajin ([1]) kantaviljelmää. Kasvin vaaleanpunertavat huomaamattomat kukat työntyvät kesäkuusta elokuuhun vedenpinnan yläpuolelle. Kasvit juurtuvat pohjaan lujilla juurakoilla, ja niitä tavataan koko pohjoisella pallonpuoliskolla rehevöityneissä, mutta pilaantumattomissa ja kalkkipitoisissa rauhallisissa mutapohjaisissa vesissä. *Myriophyllum spicatum* viihtyy parhaiten makeassa vedessä, mutta sitä tavataan myös murtovesissä.

Laboratorio-olosuhteissa viljeltävää sedimentitöntä kantaviljelmää varten tarvitaan steriilejä kasveja. Steriilejä kasveja on saatavissa Saksan liittovaltion ympäristöviraston (Umweltbundesamt) ekotoksikologian laboratoriosta.

Vaihtoehtoisesti koe-eliöt voidaan valmistaa epästeriileistä kasveista standardin ASTM E 1913-04 mukaisesti. Seuraavassa esitetään – ASTM-standardioppaasta lainattu – menettely luonnosta kerättyjen *Myriophyllum sibiricum* -kasvien viljelemiseksi:

> ”Jos viljely aloitetaan luonnosta kerätyillä epästeriileillä kasveilla, *Myriophyllum sibiricum* -kasvien talvehtimissilmut kerätään syksyllä. Talvehtimissilmut asetetaan 20 litran vetoiseen akvaarioon, jossa on 5 cm silikahiekalla tai esimerkiksi Turface®-soralla peitettyä steriiliä sedimenttiä, sekä 18 l reagenssivettä. Akvaario ilmastetaan ja sen lämpötilana pidetään 15 °C ja kokonaisvuon tiheytenä 200–300 µmol m^{-2} s^{-1} 16 tunnin ajan päivässä. Akvaariossa kasvatettavaa kasviviljelmää voidaan ylläpitää kasvien varalähteenä siltä varalta, että steriilit kasviviljelmät tuhoutuvat kasvatuskaapin mekaanisen toimintahäiriön, kontaminaation tai muun syyn vuoksi. Akvaariossa kasvatetut kasvit eivät ole steriilejä, eikä steriilejä viljelmiä voida ylläpitää panosviljelyjärjestelmässä. Viljelmän steriloimiseksi kasvit poistetaan akvaarioista ja niitä huuhdellaan virtaavassa deionisoidussa vedessä noin 0,5 tuntia. Kasvin desinfioidaan aseptisissa olosuhteissa laminaarivirtauskaapissa alle 20 minuutin ajan (kunnes suurin osa kasvikudoksesta on valkaistunut ja vain kasvukärki on edelleen vihreä) 3 tilavuusprosentin natriumhypokloriittiliuoksessa, jossa on 0,01 prosenttia sopivaa pinta-aktiivista ainetta. Desinfiointiainetta ja kasvimateriaalia ravistellaan. Useita niveliä sisältävät segmentit siirretään steriileihin viljelyputkiin, joissa on 45 ml steriloitua muutettua Andrewsin kasvualustaa, ja putket suljetaan sileillä viljelyputkien tulpilla. Kuhunkin testiastiaan laitetaan vain yksi kasvisegmentti. Viljelyastian sulkeminen varmistetaan laboratoriokäyttöön tarkoitetulla tiivistyskalvolla. Kun steriili viljelmä on perustettu, useita niveliä sisältävät kasvisegmentit on siirrettävä 10–12 päivän välein uusiin testiastioihin, jotka sisältävät tuoretta ravinneliuosta. Kuten agarmaljoissa suoritetut viljelyt ovat osoittaneet, kasvien on oltava steriilejä ja pysyttävä steriileinä kahdeksan viikon ajan, ennen kuin testaus voidaan aloittaa.”

Koska muunnettu Andrewsin kasvualusta sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), kaikkia materiaaleja, liuoksia ja viljelmiä on käsiteltävä steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

Kantaviljelmiä voidaan säilyttää heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (50 µE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) suhteellisen pitkiä aikoja käynnistämättä niitä uudelleen. *Myriophyllum*-kasvien viljelyaine voi olla sama kuin testauksessa käytetty viljelyaine, mutta kantaviljelmissä voidaan käyttää myös muita ravinteikkaita viljelyaineita.

Kasvisegmentit jaetaan akseenisesti useisiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloihin tai/ja 2 000 ml:n Fernbach-pulloihin, joista kuhunkin kaadetaan 450 ml (Erlenmeyer-pullot) tai 1 000 ml (Fernbach-pullot) muutettua Andrewsin kasvualustaa. Tämän jälkeen pullot suljetaan akseenisesti selluloosatulpilla.

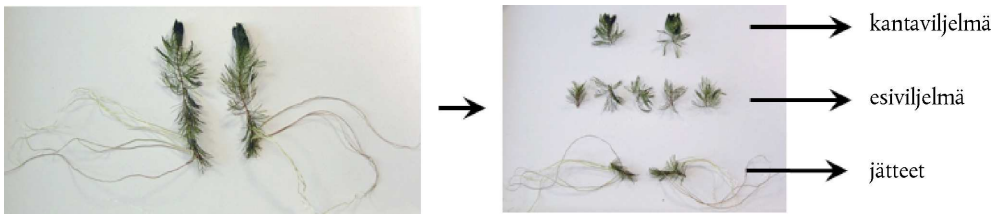
Lisäksi tarvikkeet on ehdottomasti liekitettävä steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä. Määrästä ja koosta riippuen kasvit on siirrettävä tuoreeseen ravinneliuokseen noin kolmen viikon välein.

Tähän uuteen viljelmään voidaan käyttää kärkiä sekä varren keskiosan segmenttejä. Siirrettävien kasvien (tai kasvisegmenttien) määrä ja koko riippuvat tarvittavien kasvien määrästä. Esimerkiksi voidaan siirtää viisi versosegmenttiä yhteen Fernbach-puolloon ja kolme versosegmenttiä yhten Erlenmeyer-pulloon. Kaikkien segmenttien pituus on 5 cm. Kaikki juuria kasvattaneet, kukkivat, kuolleet tai muutoin silmiinpistävät osat heitetään pois.

([1]) Carl von Linné (* 23. toukokuuta 1707, Råshult /Älmhult; † 10. tammikuuta 1778, Uppsala).

Kuva 1

Kasvien leikkaaminen kanta- ja esiviljelmää varten 3 viikkoa kestäneen viljelyn jälkeen



Kasvit viljellään 500 ml:n Erlenmeyer-pulloissa ja 2 000 ml:n Fernbach-pulloissa jäähdyttävässä inkubaattorissa 20 ± 2 °C:n lämpötilassa jatkuvassa valaistuksessa, jonka voimakkuus on noin 100–150 µE m^{-2} s^{-1} tai 6 000–9000 luksia (viljelykaapin sisäinen valaistus, värilämpötila "lämpimänvalkoinen".

Kuva 2

Kasvien viljely jäähdyttävässä inkubaattorissa, jossa on sisäinen valaistus.

Kasveja viljeltäessä on käytettävä kemiallisesti puhtaita (happopestyjä) ja steriilejä lasisia kasvatusastioita sekä aseptisia käsittelytekniikoita. Jos esimerkiksi levät, sienet ja/tai bakteerit kontaminoivat kantaviljelmän, on valmistettava uusi viljelmä tai käytettävä toisesta laboratoriosta saatavaa kantaviljelmää kyseisen viljelmän uudistamiseen.

Lisäys 4

ESIVILJELMÄN YLLÄPITO JA KOE-ELIÖN VALMISTELU TESTAUSTA VARTEN

Esiviljelmän valmistamiseksi kantaviljelmästä peräisin olevat versot leikataan segmenteiksi, joissa on kaksi kiehkuraa kussakin. Segmentit laitetaan muutetulla Andrewsin kasvualustalla(jossa on 3 prosenttia sakkaroosia) täytettyihin Fernbach-pulloihin. Kussakin pullossa voi olla enintään 50 versosegmenttiä. On kuitenkin huolehdittava siitä, että segmentit ovat elinkykyisiä eikä niissä ole juuria tai sivuhaaroja tai niiden silmuja (ks. lisäyksessä 3 oleva kuva 1).

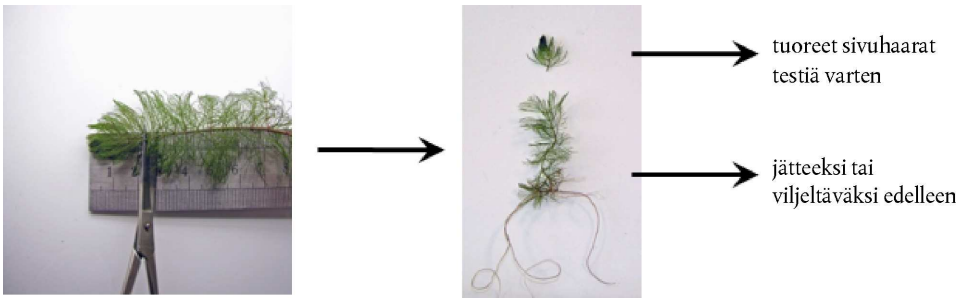
Esiviljelmän eliöitä viljellään 14–21 päivää steriileissä olosuhteissa ilmastoidussa kaapissa valaistuksessa, jossa 16 tunnin valoisat ja 8 tunnin pimeät jaksot vuorottelevat. Valon voimakkuuden on oltava 100–150 µE m^{-2} s^{-1}. Lämpötilan on oltava koeastioissa 23 ± 2 °C.

Koska muunnettu Andrewsin elatusaine sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), testikemikaalin liuokset on valmistettava ja viljely suoritettava steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

Versot poistetaan akseenisesti esiviljelypulloista, ja tässä yhteydessä valitaan mahdollisimman homogeenista materiaalia. Kuhunkin testiin tarvitaan vähintään 60 koe-eliötä (testaus kahdeksalla testikemikaalin pitoisuudella). Testausta varten esiviljelmistä otetaan tuoreita sivuhaaroja, jotka lyhennetään 2,5 cm:n pituuteen tyvestä (mittaviivaimella mitattuna) ja siirretään steriiliä muutettua Andrewsin kasvualustaa sisältävään dekantterilasiin. Näitä tuoreita sivuhaaroja voidaan käyttää sedimentittömään *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävään toksisuustestiin.

Kuva 2

Esiviljelmästä peräisin olevien kasvien leikkaaminen sedimentittömään *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävään toksisuustestiin.



C.51 *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti vesisedimenttijärjestelmässä

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 239 (2014). Testimenetelmiä on saatavilla kelluvalle yksisirkkaiselle *Lemna*-vesikasville (1) ja leville (2). Näitä menetelmiä käytetään rutiininomaisesti tuottamaan tietoja, joilla torjutaan testikemikaalien, erityisesti rikkaruohoja tuhoavien kemikaalien, vedessä kasvaville muille kuin kohdekasveille aiheuttamaa riskiä. Eräissä tapauksissa saatetaan kuitenkin tarvita tietoja muista makrofyyttilajeista. Society of Environmental Toxicology and Chemistry -järjestön (SETAC) vesimakrofyyteillä tehtävää torjunta-aineiden riskinarviointia (AMRAP) käsittelevän työpajan äskettäin julkaisemissa ohjeissa todettiin, että tietoja juurellisesta makrofyyttilajista saatetaan tarvita sellaisia tapauksia varten, joissa tiedetään, että *Lemna*-kasvit ja levät eivät ole herkkiä testikemikaalin vaikutustavalle, tai joissa ongelmana on kemikaalin jakautuminen sedimenttiin, mikä johtaa altistumiseen juuriin imeytymisen kautta (3). Nykyisen tietämyksen ja kokemuksen perusteella *Myriophyllum* spp. valittiin soveltuvimmaksi lajiksi tapauksissa, joissa tarvitaan tietoa juurellisesta kaksisirkkaisesta uposkasvilajista (4) (5) (6). Tämä testi ei korvaa muita vesieliötoksisuutta koskevia testejä; sen tarkoituksena on pikemminkin täydentää niitä ja mahdollistaa kattavampi vesikasveille aiheutuvan vaaran ja riskin arviointi. Vesisedimenttijärjestelmässä tehtävä *Myriophyllum spicatum* -testimenetelmä täydentää sedimentitöntä *Myriophyllum spicatum* -toksisuustestiä (7).

2. Tässä asiakirjassa kuvataan testimenetelmä, jolla voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia vesisedimenttijärjestelmässä kasvaviin juurellisiin *Myriophyllum spicatum* -vesikasveihin. Testimenetelmä perustuu osittain olemassa oleviin menetelmiin (1) (2) (8), ja siinä otetaan huomioon vesikasvien riskinarviointia koskeva viimeaikainen tutkimus (3). Vesisedimenttimenetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella, joka suoritettiin staattisissa olosuhteissa kasvatetuilla *Myriophyllum*-lajeilla, jotka altistettiin testikemikaalille vesipatsaan kautta tapahtuvan applikoinnin avulla (9). Testijärjestelmää on kuitenkin helppo mukauttaa siten, että mahdollistetaan altistaminen käsitellyn sedimentin kautta tai vesifaasin kautta semistaattisissa tai sykäysannoskokeissa, vaikka näistä kokeista ei ole tehty virallista yhteistutkimusta. Lisäksi yleistä menetelmää voidaan käyttää muita uposlajeja ja puolikelluvia lajeja, kuten muita *Myriophyllum*-lajeja (esimerkiksi *Myriophyllum aquaticum*) ja *Glyceria maxima* -lajia, varten (10). Käytettäessä muita lajeja testiolosuhteita, testisuunnitelma ja testin kestoa saattaa olla tarpeen muuttaa. Erityisesti *Myriophyllum aquaticum* -lajin osalta tarvitaan lisätyötä asianmukaisten menettelyjen määrittämiseksi. Näitä vaihtoehtoja ei esitetä yksityiskohtaisesti tässä testimenetelmässä, jossa kuvataan normaali menettely *Myriophyllum spicatum* -lajin altistamiseksi staattisessa järjestelmässä vesifaasin kautta.

3. Tätä testimenetelmää sovelletaan aineisiin, joita varten testimenetelmä on validoitu (ks. lähemmin kansainvälisen yhteistutkimuksen raportti (9)) tai valmisteisiin tai tunnettuihin seoksiin. *Myriophyllum*-testi voidaan suorittaa vaiheen 1 tietovaatimusten täyttämiseksi, jotka aiheutuvat testikemikaalin mahdollisesta jakautumisesta sedimenttiin tai vaikutustapaan/valikoivuuteen liittyvistä kysymyksistä. Vastaavasti laboratoriossa suoritettavaa *Myriophyllum*-testiä saatetaan tarvita osana myöhemmän vaiheen strategiaa vesikasveihin kohdistuvaa riskiä koskevien huolenaiheiden ratkaisemiseksi. Se erityinen syy, jonka vuoksi testi suoritetaan, määrää altistusreitin (veden vai sedimentin kautta). Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen sääntelytarkoituksiin, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

4. Tällä testillä on tarkoitus arvioida kemikaaleihin liittyviä vaikutuksia standardoidussa viljelyaineessa (vesi, sedimentti ja ravinteet) kasvavien *Myriophyllum*-kasvien kasvuun. Tätä varten terveistä ja kukkimattomista kasveista otettuja versojen kärkiä istutetaan standardoituun keinosedimenttiin, jota on täydennetty lisäravinteilla kasvien asianmukaisen kasvun varmistamiseksi, minkä jälkeen niitä ylläpidetään Smartin ja Barkon kasvualustassa (lisäys 1). Tietyn perustamisajan jälkeen, jonka kuluessa kasvit muodostavat juuria, kasvit altistetaan useille vesipatsaaseen lisättäville testipitoisuuksille. Vaihtoehtoisesti voidaan simuloida sedimentin kautta tapahtuvaa altistumista lisäämällä testikemikaalia keinosedimenttiin ja siirtämällä kasvit tähän käsiteltyyn sedimenttiin. Molemmissa tapauksissa kasveja ylläpidetään tämän jälkeen kontrolloiduissa ympäristöolosuhteissa 14 päivän ajan. Vaikutukset kasvuun määritetään verson pituuden, tuorepainon ja kuivapainon kvantitatiivisten määritysten sekä kloroosin, nekroosin tai epämuodostumien kaltaisten oireiden kvalitatiivisen havainnoinnin perusteella.

5. Testikemikaaliin liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrollikasvien kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran. Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona, esimerkiksi EC_{10}, EC_{20} tai EC_{50}. On syytä huomata, että EC_{10}- ja EC_{20}-arvojen arviot ovat luotettavia ja asianmukaisia vain testeissä, joissa kontrollikasvien variaatiokertoimet ovat pienemmät kuin arvioitava vaikutustaso. Toisin sanoen vaikutuskertoimien on oltava < 20 prosenttia, jotta EC_{20}-arvo voidaan arvioida luotettavasti.

6. Käsittelemättömistä ja käsitellyistä kasveista on määritettävä sekä keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (joka arvioidaan verson pituuden, verson tuorepainon ja verson kuivapainon määrittämisen perusteella) että tuotos (joka arvioidaan verson pituuden, verson tuorepainon ja verson kuivapainon kasvun määrittämisen perusteella). Spesifistä kasvunopeutta (r) ja tuotosta (y) käytetään tämän jälkeen E_rC_x-arvon (esimerkiksi E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x-arvon (esimerkiksi E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määrittämiseen.

7. Tarvittaessa keskimääräisen spesifisen kasvuvauhdin ja tuotoksen estimaateista voidaan määrittää tilastollisesti myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

8. Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testikemikaali voidaan kvantifioida riittävän herkästi.

9. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, koostumus, jos kyse on useista ainesosista koostuvista aineista, UVCB-aineista, seoksista tai valmisteista, puhtaus, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, hapon dissosiaatiovakio (pK_a), jakaantumiskerroin oktanoli/vesi (K_{ow}), K_d sedimenteissä, jos käytettävissä, höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää merkittävästi testin aikana. Jos testikemikaalin häviäminen on todennäköistä, häviämä on kvantifioitava ja toimenpiteet häviämisen kontrolloimiseksi on dokumentoitava. Jos testikemikaali(e)n liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään. *Huomautus:* Testattaessa valosta riippuvaisia peroksidoituvia kasvinsuojeluaineita käytettävässä laboratariovalaistuksessa on oltava luonnollista auringonvaloa vastaavaa ultraviolettivaloa.

10. Testiviljelyaineen pH-arvo on mitattava ja sitä on tarvittaessa mukautettava. Testiviljelyaineen pH:n tarkistaminen on erityisen tärkeää esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja kemikaaleja. OECD:n ohjeasiakirjassa (11) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaaliskemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

TESTIN VALIDITEETTI

11. Jotta testituloksia voidaan pitää luotettavina, kontrollikasvien versojen kokonaispituuden keskiarvon ja versojen kokonaistuorepainon keskiarvon on vähintään kaksinkertaistuttava testin altistusvaiheen aikana. Lisäksi kontrollikasvit eivät saa osoittaa mitään näkyviä kloroosin oireita eikä kasveissa, sedimentin pinnassa ja testiviljelyaineessa saa näkyä muiden organismien aiheuttamaa kontaminaatiota, kuten leviä ja/tai bakteerikalvoja.

12. Versojen tuorepainon mittauksiin perustuvan tuoton (testin aloittamisesta testin päättämiseen) keskimääräinen variaatiokerroin kontrolliviljelmissä ei saa olla yli 35 prosenttia rinnakkaisnäytteiden välillä.

VERTAILUKEMIKAALI

13. Vertailukemikaali(t), kuten kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (9) käytetty 3,5-dikloorifenoli, on testattava säännöllisesti testimenettelyn toimivuuden ajoittaiseksi tarkistamiseksi. Kansainvälisen yhteistutkimuksen tietojen mukaan 3,5-dikloorifenolin keskimääräiset EC_{50}-arvot eri vastemuuttujille ovat 4,7–6,1 mg/l (tarkempia tietoja näiden arvojen ennakoidusta luottamusvälistä on kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa). Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain varsinaisten toksisuustestien kanssa. Kansainvälisen yhteistutkimuksen (9) tilastoraportissa annetaan ohje 3,5-dikloorifenolin odotetuista EC_{50}-arvoista.

MENETELMÄN KUVAUS

Testauslaitteet

14. Testi on suoritettava kontrolloiduissa ympäristöolosuhteissa, kuten kasvatuskaapissa, kasvatushuoneessa tai laboratoriossa, joissa päivän pituus, valaistus ja lämpötila ovat säädettävissä (ks. jakso "Testiolosuhteet", 56–58 kohta). Kantaviljelmiä on ylläpidettävä erillään testiastioista.

15. Testissä on käytettävä lasisia testiastioita, kuten akvaarioita tai dekantterilaseja; yleisesti käytetään 2 litran dekantterilaseja (korkeus noin 24 cm ja halkaisija 11 cm). Muut (suuremmat) astiat voivat kuitenkin olla soveltuvia, mikäli veden syvyys niissä on riittävä mahdollistamaan rajoittamattoman kasvun ja pitämään kasvit upoksissa testin ajan.

16. Muovisia tai lasisia kasviruukkuja (joiden halkaisija on noin 9 cm, korkeus 8 cm ja tilavuus 500 ml) voidaan käyttää säiliöinä kasvien istuttamiseksi sedimenttiin. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää lasisia dekantterilaseja, ja ne ovat suositeltavia joissain tapauksissa (esimerkiksi testattaessa hydrofobisia kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden K_{ow}-arvo on suuri).

17. Valittavan ruukun/dekantterilasin kokoa on harkittava valittavien testiastioiden ja paremmin soveltuvan testimenetelmän (ks. jäljempänä) ohella. Jos käytetään testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti), saatetaan tarvita pienempiä ruukkuja tai suurempia astioita. Jos käytetään testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti), edellä mainitut ruukkujen ja astioiden koot lienevät riittävät. Kaikissa tapauksissa sedimentin päällä olevan veden vähimmäissyvyyden on oltava 12 cm, ja sedimentin tilavuuteen suhteutetun pinta-alan suhde veden tilavuuteen suhteutettuun pinta-alaan on kirjattava.

Koe-eliö

18. Tässä testimenetelmässä kuvattuja yleisiä menettelyjä voidaan käyttää useiden erilaisten vesikasvilajien testaamiseen. Tässä testimenetelmässä esitetyt olosuhteet on kuitenkin sovitettu nimenomaan *Myriophyllum spicatum* -ärviälajilla tehtäviä testejä varten. Tämä laji kuuluu kaksisirkkaisten ärviäkasvien (Haloragaceae) heimoon.

19. *Myriophyllum spicatum* (tähkä-ärviä) on juurellinen uposkasvi, joka kestää monenlaisia olosuhteita ja jota tavataan sekä seisovissa että virtaavissa vesistöissä. *M. spicatum* on monivuotinen kasvi, joka talvehtii juurissa. Tavallisesti nämä kasvit kukkivat ja siementävät runsaasti, mutta usein ne leviävät ensisijaisesti suvuttoman lisääntymisen avulla hankasilmuista tai luonnollisesti tai veden sekoittumisen seurauksena irtoavista varren osista.

Koe-eliön viljely

20. Kasvit voidaan hankkia luonnollisista populaatioista tai vesikasvien toimittajilta. Molemmissa tapauksissa kasvien alkuperä on dokumentoitava ja lajinmääritys vahvistettava. Kerättäessä *Myriophyllum spicatum* -kasveja luonnosta on varmistettava huolellisesti, että kerätään oikeaa lajia, erityisesti alueilla, jossa se voi risteytyä muiden *Myriophyllum*-lajien kanssa. Epävarmoissa tilanteissa suositellaan tunnetuista lähteistä saatuja varmennettuja laboratorioviljelmiä. Kasveja, jotka ovat altistuneet kemiallisille epäpuhtauksille tai jotka on kerätty kontaminoituneiksi tiedetyiltä paikoilta, ei saa käyttää tässä testissä.

21. Alueilla, joilla *Myriophyllum spicatum* -kasveja ei ole helposti saatavissa talvikuukausina, saattaa olla tarpeen ylläpitää pitkäaikaisia kantaviljelmiä kasvihuoneessa tai laboratorio-olosuhteissa. Kantaviljelmiä on ylläpidettävä testiolosuhteita vastaavissa olosuhteissa, mutta viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Myriophyllum*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa. Testeissä käytettäviä akvaarioita ja kasviruukkuja suurempien akvaarioiden ja ruukkujen käyttö on suositeltavaa, jotta lisääntymiselle on tilaa. Sedimentin ja vesi-viljelyaineen koostumuksen on oltava sama kuin testeissä käytetyn koostumuksen, mutta sedimentin lannoitukseen voidaan käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä (esimerkiksi kaupallisia hitaasti vapautuvia lannoitevalmisteita).

22. Kantaviljelmän kasveissa ei saa olla näkyvää muiden organismien aiheuttamaa kontaminaatiota, kuten etanoita, rihmaleviä, sieniä ja hyönteisiä, esimerkiksi *Paraponyx stratiotata* -koiperhosen munia tai toukkia tai *Eubrychius velutus* -kuoriaisen toukkia tai aikuisia. Kasvimateriaalin huuhtominen tuoreessa vedessä saattaa olla tarpeen näkyvän kontaminaation poistamiseksi. Lisäksi on pyrittävä minimoimaan yksisoluisten levien kehittyminen ja bakteerikontaminaatio, mutta kasvimateriaalin ei tarvitse olla täydellisen steriiliä. Kantaviljelmiä on seurattava ja ne on tarvittaessa siirrettävä levä- ja bakteerikontaminaation välttämiseksi. Kantaviljelmien ilmastus saattaa olla hyödyllistä, jos levä- tai bakteerikontaminaatio muodostuu ongelmaksi.

23. Kaikissa tapauksissa kasveja viljellään/akklimatisoidaan testiolosuhteiden kanssa samankaltaisissa, mutta ei välttämättä identtisissä, olosuhteissa riittävän pitkään (yli 2 viikkoa) ennen niiden käyttämistä testissä.

24. Kukkivia kantaviljelmiä ei saa käyttää testissä, koska kasvien kasvunopeus yleensä hidastuu kukinnan aikana ja sen jälkeen.

Sedimentti

25. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu tämän liitteen luvussa C.28 (8) käytettyyn keinosedimenttiin. Sedimentti valmistetaan testimenetelmässä C.28 kuvatun mukaisesti, minkä lisäksi siihen lisätään ravinteita seuraavasti:

    a) 4–5 prosenttia (kuivapaino, kun orgaanisen hiilen osuus on 2 ± 0,5 prosenttia) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

    b) 20 prosenttia (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia)

    c) 75–76 prosenttia (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 µm:n hiukkasia)

    d) Sedimenttiin lisätään vesiliuoksessa olevaa ravinneviljelyainetta siten, että lopullisessa sedimenttierässä on 200 mg sekä ammoniumkloridia että natriumfosfaattia kuivaa sedimenttikiloa kohti ja lopullisen seoksen kosteuspitoisuus on 30–50 prosenttia.

    e) Kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5.

26. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperä on tunnettava ja dokumentoitava. Jos alkuperä on tuntematon tai herättää huolta, kyseisten ainesosien kemiallinen kontaminaatio (esimerkiksi raskasmetallit, orgaanista klooria sisältävät yhdisteet, orgaanista fosforia sisältävät yhdisteet) on tarkistettava.

27. Sedimentin kuivat ainesosat on sekoitettava homogeeniseksi seokseksi, ennen kuin vesiliuoksessa oleva ravinneliuos sekoitetaan perusteellisesti sedimenttiin. Kostea sedimentti on valmistettava vähintään kaksi päivää ennen käyttöä, jotta turve kastuu läpikotaisin ja estetään hydrofobisten turvehiukkasten kelluminen pintaan, kun sedimentti peitetään viljelyaineella; ennen käyttöä kostea sedimentti voidaan varastoida pimeässä.

28. Testiä varten sedimentti siirretään sopivan kokoisin astioihin, kuten kasviruukkuihin, joiden halkaisija on sellainen, että ne sopivat lasiastioihin (sedimentin pinta-alan on katettava noin 70 prosenttia tai enemmän astian pinta-alasta). Jos astian pohjassa on reikiä, astian pohjaan asetettava suodatinpaperin pala auttaa pitämään sedimentin astiassa. Ruukut täytetään sedimentillä siten, että sedimentin pinta on tasainen, minkä jälkeen ne peitetään ohuella kerroksella (~ 2–3 mm) inerttiä materiaalia, kuten hiekkaa tai hienoa puutarhahiekkaa (tai korallimurskaa), sedimentin pitämiseksi paikoillaan.

Testiviljelyaine

29. *Myriophyllum spicatum* -kasvien viljelyyn ja testaamiseen suositellaan Smartin ja Barkon kasvualustaa (12). Tämän viljelyaineen valmistus kuvataan lisäyksessä 1. Viljelyaineen (vesifaasi) pH:n on testin alussa oltava 7,5–8,0, jotta kasvit kasvavat optimaalisesti.

Testijärjestely

30. Testiin on sisällyttävä vähintään kuusi rinnakkaista testiastiaa käsittelemätöntä kontrollia varten ja vähintään neljä rinnakkaista testiastiaa kutakin pitoisuutta varten vähintään viidestä pitoisuustasosta.

31. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden.

32. Kukin testiastia muodostaa kolme versoa sisältävän toiston. Kolmen verson kasvattamiseksi kussakin testiastiassa on kaksi vaihtoehtoa:

— Testimenetelmä A: yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti.

— Testimenetelmä B: kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti.

— Vaihtoehtoiset testijärjestelyt, joissa on yksi verso ruukkua ja yksi ruukku testiastiaa kohti, ovat hyväksyttäviä, mikäli toisto mukautetaan siten, että validiteettivaatimukset täyttyvät.

33. Yksittäiset testiastiat osoitetaan satunnaisvalinnalla käsittelyryhmiin. Koeastiat on sijoitettava testialueelle satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet.

Testikemikaalin pitoisuudet ja kontrolliryhmät

34. Testipitoisuuksien olisi tavallisesti oltava geometrisessa sarjassa, eikä niiden välinen kerroin saisi olla suurempi kuin 3,2. Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testikemikaalin toksisuudesta on saatavilla aiempia tietoja alustavasta pitoisuusalueen määrityskokeesta.

35. EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta. Useampien testipitoisuuksien käyttö parantaa tuloksena saatavan EC_x-arvon luottamusväliä.

36. LOEC/NOEC-pitoisuuden (valinnainen päätepiste) määrittämiseksi pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei poikkea merkittävästi kontrollikasvien kasvusta. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Useampien toistojen käyttö lisää vaikutuksettoman pitoisuuden / ANOVA-menetelmän tilastollista voimaa.

Raja-annostesti

37. Jos alueenmääritykseen osoittaa, että testikemikaalilla ei ole haittavaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testikemikaalilla on testiviljelyaineessa, tai jos kyseessä on valmiste, sen dispergoituvuusrajaan asti, voidaan tehdä raja-annostesti, jolla helpotetaan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteiden vertailua (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa, tai pitoisuudessa 1 000 mg/kg kuivasta sedimentistä). Tämän testin on noudatettava vakiomuotoisen annos-vastekokeen yleisperiaatteita sillä poikkeuksella, että toistojen vähimmäismäärä suositellaan lisättävän kuuteen testiastiaan kontrollia ja pitoisuutta kohti. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

Testiliuokset

38. Testiliuokset valmistetaan tavallisesti laimentamalla kantaliuosta, joka on valmistettu liuottamalla tai dispergoimalla testikemikaali Smartin ja Barkon kasvualustaan, käyttäen demineralisoitua (eli tislattua tai deionisoitua) vettä (ks. lisäys 1).

39. Suurin testipitoisuus ei normaalisti saa ylittää testikemikaalin vesiliukoisuusrajaa tai valmisteiden kohdalla dispergoituvuusrajaa testiolosuhteissa.

40. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä kemikaalista väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testikemikaalimäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testikemikaalin dispersiota ja liukenemista. Tällaisten liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 µl/l. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 µl/l). Tällaisessa tilanteessa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä näytteissä ja (liuotin-)kontrolleissa. Myös käsittelemättömät kontrollitoistot, jotka eivät sisällä liuotinta tai dispergointiainetta, sisällytetään testijärjestelyyn. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita OECD:n ohjeasiakirjassa (11).

TESTIMENETTELY

41. Testimenettely vaihtelee sen mukaan, mitä testikemikaalin applikointireittiä (vesi- vai sedimenttifaasi) käytetään. Testikemikaalin todennäköinen käyttäytyminen vesisedimenttijärjestelmässä on otettava huomioon valittaessa testissä käytettävää altistusjärjestelmää (staattinen vai staattinen ajoittaisvaihto, testikemikaalin lisääminen veteen vai sedimenttiin). Käsitellyllä sedimentillä tehtävät testit saattavat joissain tapauksissa olla suositeltavia sellaisille kemikaaleille, joiden ennustetaan jakautuvan merkittävästi sedimenttiin.

Perustamisvaihe

42. Viljelmän kasveista leikataan terveitä versojen kärkiä, joissa ei ole sivuversoja, siten, että verson pituus on 6 cm (± 1 cm). Testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti) varten kuhunkin ruukkuun istutetaan yksi verson kärki. Testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti) varten kuhunkin sedimenttiä sisältävään ruukkuun istutetaan neljä tai viisi verson kärkeä.

43. Molemmissa tapauksissa versoja on istutettava ylimääräisiin ruukkuihin, jotta testin alussa voidaan valita yhtenäistä kasvimateriaalia ja saadaan varakasveja, joita käytetään juurien kasvun tarkastamiseen välittömästi ennen käsittelyä ja joita kerätään versojen biomassan ja pituuden mittauksiin päivänä 0.

44. Versot istutetaan siten, että noin 3 cm osuus, jossa on vähintään kaksi niveltä, on sedimentin pinnan alla.

45. Tämän jälkeen ruukut siirretään testiastioihin samoissa ympäristöolosuhteissa kuin joita käytetään altistusvaiheessa ja niitä ylläpidetään seitsemän päivän ajan Smartin ja Barkon kasvualustassa juurien kehittymisen indusoimiseksi.

46. Tämän jälkeen vararuukuista otetaan useita kasveja juurien kasvun tarkastamiseksi. Jos näkyvää juurien kasvua ei ole (eli juurien kärkiä ei näy), perustamisvaihetta jatketaan, kunnes juurien kasvu on näkyvää. Tämä vaihe on suositeltava sen varmistamiseksi, että kasvit kasvavat aktiivisesti, kun testi aloitetaan.

Yhtenäisen kasvimateriaalin valinta

47. Testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti) varten ruukut valitaan yhtenäisyyden perusteella ennen testin aloittamista. Testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti) varten ylimääräiset kasvit poistetaan siten, että jäljelle jää kolme kooltaan ja ulkonäöltään yhtenäistä kasvia.

Altistaminen vesifaasin kautta

48. Yhtenäisyyden perusteella valitut ruukut sijoitetaan testiastioihin koejärjestelyn edellyttämällä tavalla. Tämän jälkeen testiastioihin lisätään Smartin ja Barkon kasvualustaa. Varovaisuutta on noudatettava, jotta vältetään sedimentin sekoittumista. Tätä varten viljelyaine voidaan lisätä suppilon avulla tai sedimentti voidaan peittää muovilevyllä kaadettaessa viljelyainetta testiastioihin edellyttäen, että levy poistetaan välittömästi tämän jälkeen. Vaihtoehtoisesti kasviruukut voidaan sijoittaa testiastioihin viljelyaineen lisäämisen jälkeen. Molemmissa tapauksissa altistusvaiheen alussa voidaan tarvittaessa käyttää tuoretta viljelyainetta mahdollisen levien ja bakteerien muodostumisen minimoimiseksi ja yksittäisten testiliuoserien valmistamisen mahdollistamiseksi eri toistoissa.

49. Verson sedimentin yläpuolinen pituus mitataan joko ennen viljelyaineen lisäämistä tai sen jälkeen.

50. Asianmukaiset testikemikaalimäärät voidaan lisätä testiviljelyaineeseen ennen sen lisäämistä testiastioihin. Vaihtoehtoisesti testikemikaali voidaan lisätä viljelyaineeseen sen jälkeen, kun viljelyaine on lisätty testiastioihin. Tässä tapauksessa on huolehdittava siitä, että testikemikaali jakautuu tasaisesti koko testijärjestelmään sekoittamatta sedimenttiä.

51. Kaikissa tapauksissa testiviljelyaineen ulkonäkö (esimerkiksi kirkas tai samea) kirjataan testin alussa.

Altistus sedimentin kautta

52. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testikemikaaliliuosta suoraan tuoreeseen sedimenttiin. Testiaineen kantaliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esim. heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua ja hiekka sekoitetaan sopivaan määrään sedimenttiä dekantterilasia kohti. Testikemikaalin liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On muistettava, että testikemikaalilla käsitellyn hiekan tilavuus/paino on otettava huomioon sedimentin lopullisessa valmistuksessa (eli sedimentin valmistamisessa on käytettävä vähemmän hiekkaa). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testikemikaali sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti.

53. Ruukut täytetään testikemikaalilla käsitellyllä sedimentillä (edellä kuvatun mukaisesti). Yhtenäisyyden ja riittävän juuriston perusteella valitut kasvit poistetaan perustamisvaiheen aikana käytetyistä ruukuista ja istutetaan testikemikaalilla käsiteltyyn sedimenttiin edellä kuvatun mukaisesti.

54. Ruukut sijoitetaan testiastioihin koejärjestelyn edellyttämällä tavalla. Tämän jälkeen lisätään Smartin ja Barkon kasvualustaa varovaisesti (esimerkiksi suppilon avulla), jotta sedimenttiä ei sekoiteta. Verson sedimentin yläpuolinen pituus mitataan joko ennen viljelyaineen lisäämistä tai sen jälkeen.

Vedenpinnan tason ylläpito testin aikana

55. Lopullinen veden tilavuus on kirjattava ja vedenpinnan taso on merkittävä jokaiseen testiastiaan. Jos vettä haihtuu testin aikana yli 10 prosenttia, vedenpinnan tasoa on säädettävä tislatulla vedellä. Tarvittaessa dekantterilasit voidaan peittää löyhästi esimerkiksi muovisilla läpinäkyvillä kansilla, haihtumisen ja leväitiökontaminaation minimoimiseksi.

Testiolosuhteet

56. Testissä käytetään lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon säteilyvoimakkuudeksi saadaan noin 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) veden pinnasta, ja valoisien ja pimeiden jaksojen kestot ovat 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää. Valon säteilyvoimakkuus ei saa vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia testialueen yläpuolella.

57. Lämpötilan on oltava testiastioissa 20 ± 2 °C.

58. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Tätä suurempi poikkeama ei kuitenkaan mitätöi testiä, jos edellä määritettyjen validiteettivaatimusten voidaan osoittaa täyttyvän.

Testin kesto

59. Altistuksen kesto on 14 vuorokautta.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

60. Perustamisvaiheen jälkeen ja välittömästi ennen käsittelyä (eli päivänä 0) kerätään varakasveja viidestä satunnaisesti valitusta ruukusta, jos sovelletaan kolmea kasvia ruukkua kohti käyttävää testijärjestelyä, tai 15 ruukusta, jos sovelletaan yhtä kasvia ruukkua kohti käyttävää testijärjestelyä, verson pituuden ja tuore- ja kuivapainon määrittämiseksi jäljempänä kuvaillulla tavalla.

61. Altistusvaiheeseen siirretyistä kasveista tehdään seuraavat määritykset taulukon 1 mukaisesti:

— Pääverson pituuden, sivuversojen määrän ja sivuversojen pituuden määritykset kirjataan vähintään altistusajan lopussa (eli päivänä 14).

— Näönvaraiset arvioinnit kasvien terveydestä kirjataan vähintään kolme kertaa altistusajan aikana (esimerkiksi päivinä 0, 7 ja 14).

— Versojen tuorepaino ja kuivapaino määritetään testin lopussa (eli päivänä 14).

62. Verson pituus määritetään mittaviivaimella. Jos sivuversoja on, niiden määrä ja pituus on myös määritettävä.

63. Näönvaraiset arvioinnit kasvien terveydestä tehdään kirjaamalla kasvien ulkonäkö ja testiviljelyaineen yleistila. Havainnoitavia seikkoja ovat muun muassa

— nekroosi, kloroosi tai muut värimuutokset, kuten kontrollikasveihin verrattuna liiallinen punertuminen

— bakteeri- tai leväkontaminaation muodostuminen

— kasvuhäiriöt, kuten hidastunut kasvu, muutokset nivelvälin pituudessa, epämuodostuneet versot/lehdet, sivuversojen lisääntyminen, lehtien menetys, nestejännityksen häviäminen ja varren fragmentoituminen.

— Juurien terveys arvioidaan näönvaraisesti testin lopussa pesemällä varovaisesti sedimentti juurista, jotta juuristoa voidaan havainnoida. Ehdotettu arviointiskaala kontrollikasveihin verrattuna on seuraava:

1) ei juuria

2) vähän juuria

3) juuret kehittyneet kohtalaisesti

4) juuret kehittyneet erittäin hyvin, kontrolleja vastaavasti.

64. Versojen tuorepaino määritetään testin alussa ja lopussa katkaisemalla verso sedimentin tasolta ja imeyttämällä se kuivaksi ennen punnitsemista. Verson tyveen mahdollisesti tarttuneet sedimenttihiukkaset on poistettava huolellisesti. Tämän jälkeen versomateriaali kuivataan kuivausuunissa, jonka lämpötila on noin 60 °C, vakiopainoon, minkä jälkeen se punnitaan uudelleen ja kirjataan kuivapaino.

65. Taulukossa 1 esitetään yhteenveto testin aikana tehtävistä biologisista vähimmäisarvioinneista.

Taulukko 1

Arviointiaikataulu

Käsittelyn jälkeinen päivä nro	*Myriophyllum spicatum*			
	Verson pituus, sivuversojen pituus ja määrä	Versojen näönvarainen arviointi	Versojen tuore- ja kuivapaino Juurien näönvarainen arviointi	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: arvioinnit on tehtävä näinä päivinä.
—: mittauksia ei tarvita.

Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys

66. Viljelyaineen lämpötila ylimääräisessä astiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä (tai jatkuvasti tiedonkeruulaitteen avulla).

67. Testiviljelyaineen pH ja liuenneen hapen pitoisuus on tarkistettava testin alussa, ainakin kerran testin aikana ja testin lopussa kaikissa toistoissa käytetyissä astioissa. Kullakin kerralla mittaukset on tehtävä samaan aikaan päivästä. Jos kaikkien toistojen valmistamiseen kussakin pitoisuudessa käytetään bulkkiliuoksia, on hyväksyttävää tehdä vain yksi mittaus kustakin bulkkiliuoksesta päivänä 0.

68. Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä veden pinnasta. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin alussa tai sen aikana. Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

Testikemikaalin analyyttiset mittaukset

69. Testikemikaalin asianmukaisen applikoinnin tueksi on tehtävä testikemikaalin pitoisuuksien analyyttisia mittauksia.

70. Testikemikaalin analyysiä varten on otettava vesinäytteitä pian testin aloittamisen jälkeen (stabiilien testikemikaalien applikointipäivänä tai tunti epästabiilien kemikaalien applikoinnin jälkeen) ja testin lopussa kaikista testipitoisuuksista.

71. Pitoisuudet sedimentissä ja sedimentin huokosvedessä on määritettävä testin alussa ja lopussa vähintään suurimmassa testipitoisuudessa, ellei testikemikaalien tiedetä olevan stabiileja vedessä (> 80 prosenttia nimellisarvosta). Sedimentin ja huokosveden mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testikemikaalin jakautuminen veden ja sedimentin välille on määritetty selkeästi vesi/sedimentti-tutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (esim. sedimentin ja veden suhde, applikointimenetelmä, sedimenttityyppi).

72. Näytteenotto sedimentistä testin alussa häiritsee todennäköisesti testijärjestelmää. Näin ollen saatetaan tarvita ylimääräisiä käsiteltyjä testiastioita analyyttisten määritysten helpottamiseksi testin alussa ja lopussa. Vastaavasti jos päivänä 7 tehtävät väliarvioinnit katsotaan tarpeellisiksi ja analyysit edellyttävät suuria sedimenttinäytteitä, joita ei voida helposti poistaa testijärjestelmästä, analyyttiset määritykset on tehtävä käyttämällä ylimääräisiä testiastioita, jotka on käsitelty samalla tavoin kuin biologisiin arviointeihin käytettävät astiat.

73. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testikemikaali ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joissain tapauksissa pitoisuuksien analysoiminen huokosvedestä ei ehkä ole mahdollista, jos näytteen koko on liian pieni.

74. Semistaattisissa testeissä (altistus vesifaasin kautta), joissa testikemikaali(e)n pitoisuuksien ei oleteta pysyvän 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta koko testin ajan ilman testiliuosten vaihtamista, on kaikista käytetyistä ja vastavalmistetuista testiliuoksista otettava kunkin vaihdon yhteydessä näyte testikemikaalin pitoisuuden analyysia varten..

75. Tapauksissa, joissa testikemikaalin mitattu alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista.

76. Joka tapauksessa testikemikaalin pitoisuus tarvitsee määrittää vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle. Vaihtoehtoisesti testiliuokset kaikista kunkin pitoisuuden toistoista voidaan yhdistää analysointia varten.

77. Jos on näyttöä siitä, että testipitoisuus on pysynyt tyydyttävästi 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi ja sitä seuraava päätepisteiden johtaminen voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin.

78. Näissä tapauksissa vaikutuspitoisuuksien on perustuttava nimellispitoisuuksiin tai testin alussa vedestä mitattuihin pitoisuuksiin.

79. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että pitoisuus on laskenut (eli se ei ole pysynyt 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta käsitellyssä osassa) testin aikana, tulosten analysoinnin on perustuttava altistuksen aikaisen pitoisuuden geometriseen keskiarvoon tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä käsitellyssä osassa (11).

TIETOJEN ARVIOINTI

80. Tapauksissa, joissa tarvitaan liuottimen/dispergointiaineen käyttöä, liuotinkontrolleista ja käsittelemättömistä kontrolleista saadut tiedot voidaan yhdistää tilastoanalyysiä varten, mikäli käsittelemättömien ja liuotinkontrollien vasteet eivät poikkea tilastollisesti merkittävästi toisistaan.

Vastemuuttujat

81. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset testattavan lajin kasvuun kahden vastemuuttujan, keskimääräisen spesifisen kasvun ja tuotoksen, avulla seuraavasti:

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

82. Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä versojen kokonaispituuden, kokonaistuorepainon ja kokonaiskuivapainon logaritmiarvossa tietyn ajan kuluessa tapahtuneen muutoksen perusteella. Tämä muuttuja lasketaan kunkin kontrolli- ja käsitellyn ryhmän jokaisesta toistosta. Kussakin testiastiassa (toisto) olevien kolmen kasvin keskipituus ja -paino ja sen perusteella kunkin toisto kasvunopeus lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

jossa

μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

t = aikaväli i–j

83. Toistojen vasteista lasketaan kunkin testi- ja kontrolliryhmän kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

84. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki "i" tarkoittaa testin alkua ja hetki "j" testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

85. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

jossa

% Ir = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μC = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

μT = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

Tuotos

86. Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä versojen kokonaispituudessa, kokonaistuorepainossa ja kokonaiskuivapainossa tietyn ajan kuluessa tapahtuneen muutoksen perusteella. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% Iy) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

jossa

% I_y = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

b_C = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

b_T = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen

87. Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan edellä esitetyn mukaisesti) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

EC_x-pitoisuuden arviointi

88. EC_x-pitoisuuden (esimerkiksi EC_{50}-pitoisuuden) estimaattien on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x), joista kummankin on puolestaan perustuttava versojen kokonaistuorepainoon, versojen kokonaiskuivapainoon ja versojen kokonaispituuteen.

89. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut EC_x-arvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat useimmiten suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen.

Tilastomenetelmät

90. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (13) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (13). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (14), (15), (16) ja (17) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

91. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Kunkin estimaatin osalta määritetään 95 prosentin luottamusrajat, ja vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

92. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (18), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

93. LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Kunkin pitoisuuden keskiarvoa verrataan tämän jälkeen kontrollin keskiarvoon käyttämällä sopivaa testimenetelmää (esimerkiksi Dunnettin tai Williamsin testiä) (19) (20) (21) (22). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin normaalijakaumasta (ND) ja varianssin homogeenisuudesta (VH) paikkansa. Tämä arviointi on tehtävä Shapiro-Wilk-testillä (ND) tai Levenen testillä (VH). Jos oletus varianssien normaalijakaumasta ja homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus ja/tai poikkeama normaalijakaumasta on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Bonferronin ja Welchin t-testi, alaspäin askeltava Jonckheere-Terpstra-testi ja Bonferronin mediaanitesti. Kirjallisuusviitteessä (16) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

RAPORTOINTI

94. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testilajit

— tieteellinen nimi ja alkuperä.

Testiolosuhteet

— perustamisvaiheen kesto ja olosuhteet

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai sykäysannosmenetelmä)

— testin alkamispäivä ja kesto

— testiviljelyaine eli sedimentti ja ravinneliuos

— kuvaus testijärjestelystä: kasvatuskaappi tai -huone tai laboratorio, testiastiat ja kannet, liuosmäärät, testikasvien pituus ja paino testiastiaa kohti testin alussa, sedimentin pinta-alan suhde veden pinta-alaan, sedimentin ja veden tilavuuden suhde

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä

— lämpötila testin aikana

— valonlähde, säteilyvoimakkuus ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)

— testi- ja kontrolliviljelyaineiden pH-arvot sekä testiviljelyaineiden ulkonäkö testin alussa ja lopussa

— happipitoisuudet

— analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit)

— mittausmuuttujien, kuten pituuden, kuivapainon ja tuorepainon, määritysmenetelmät

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä.

Tulokset

— käsittelemättömät tulokset: kussakin ruukussa olevien kasvien versojen pituus ja paino sekä muut mittausmuuttujat kussakin testi- ja kontrolliastiassa kullakin taulukossa 1 esitetyn arviointiaikataulun mukaisella havainnointi- ja analysointikerralla

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat

— kunkin pitoisuuden kasvukäyrät

— kaksinkertaistumisaika/kasvunopeus kontrollissa versojen pituuden ja tuorepainon perusteella, tuorepainon tuotoksen variaatiokerroin mukaan luettuna

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys

— toksisuusarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi pienin merkitsevä erotus)

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tässä liitteessä oleva C.26 luku: Limaskojen (Lemna-lajien) kasvunestymistesti.

(2) Tässä liitteessä oleva C.3 luku: Makean veden levien ja syanobakteerien kasvunestymistesti

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, s. 199–206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, s. 715–722.

(7) Tässä liitteessä oleva C.50 luku: Sedimentitön *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti.

(8) Tässä liitteessä oleva C.28 luku: Toksisuustesti *Chironomid*-eliöllä vesi-sedimenttisysteemissä käyttäen vettä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, s. 231–237.

(11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, s. 251–263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, s. 713–718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, s. 157–167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, s. 1485–1494.

(16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, s. 93–96.

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, s. 1096–1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, s. 482–491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, s. 103–117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, s. 519–531.

Lisäys 1

SMARTIN JA BARKON KASVUALUSTAN KOOSTUMUS

Ainesosa	Veteen (*) lisätty reagenssin määrä (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (ilmatasapaino)	7,9

(*) Demineralisoitua (eli tislattua tai deionisoitua) vettä.

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin tuore- ja/tai kuivapaino. Tässä testissä biomassa on pääverson, kaikkien sivuhaarojen ja kaikkien juurien summa.

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa *Myriophyllum spicatum* -kasvin kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia "E_rC" ja jälkimmäisestä symbolia "E_yC", joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (pääverson pituus).

Kasvu: mittausmuuttujan, kuten pääverson pituuden, sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): mitattavan muuttujan logaritminen kasvu altistuksen aikana. *Huomautus*: Kasvunopeuteen liittyvät vastemuuttujat ovat riippumattomia testin kestosta, jos altistamattomien kontrollieliöiden kasvu on eksponentiaalista.

Kemikaali: aine tai seos.

Kloroosi: koe-eliön, erityisesti kiehkuroiden, värin muutos vihreästä kellertäväksi.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä testimenetelmässä mittausmuuttujia ovat pääverson pituus, sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä.

Monokulttuuri: yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi on testieliön kuollutta (eli valkoista tai tummanruskeaa) kudosta.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Testin päätepiste kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä testimenetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo. Huom. Kun altistamattomien eliöiden kasvu on eksponentiaalista, tuotokseen perustuvat vastemuuttujat vähenevät testin keston pidentyessä.

UVCB-aine: koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan toksisuutta. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeus ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten pääverson pituudesta, versojen kokonaispituudesta, tuorepainosta, kuivapainosta tai kiehkuroiden määrästä."

ISSN 1977-0812 (sähköinen julkaisu)
ISSN 1725-261X (painettu julkaisu)

Euroopan unionin julkaisutoimisto
2985 Luxemburg
LUXEMBURG

FI