



Euroopan unionin
neuvosto

Bryssel, 25. helmikuuta 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

SAATE

Lähettiläjä:	Euroopan komissio
Saapunut:	22. helmikuuta 2019
Vastaanottaja:	Neuvoston pääsihteeristö
Asia:	Liite asiakirjaan KOMMISSION ASETUS (EU) .../..., annettu XXX, 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

Valtuuskunnille toimitetaan oheisena asiakirja D060575/02 – Liite.

Liite: D060575/02 – Liite

B.71 IHON HERKISTYMISTESTIT *IN VITRO*, JOISSA KÄSITELLÄÄN KESKEISTÄ TAPAHTUMAA ELI DENDRIITTISOLUJEN AKTIVOITUMISEN VAIKUTUSTA IHON HERKISTYMISEN HAITTAVAIKUTUSREITTIIN

YLEISJOHDANTO

Dendriittisolujen aktivoitumiseen keskeisenä tapahtumana perustuva testimenetelmä

1. Ihoa herkistävällä aineella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun EU-asetuksen 1272/2008 (CLP-asetus)¹ määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Nykyiset tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty OECD:n AOP-ohjelmassa tiivistetysti haittavaikutusreitteinä (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) herkistymisen käynnistävästä molekyyli-tason tapahtumasta haittavaikutukseen eli allergiseen kosketusihottumaan. Herkistymisen käynnistävä molekyyli-tason tapahtuma (eli ensimmäinen keskeinen tapahtuma) on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin. Toinen keskeinen tapahtuma tässä haittavaikutusreitissä tapahtuu keratinosyyteissä; se käsittää tulehdusvasteita ja geeniekspression muutoksia, jotka liittyvät tiettyihin solujen viestinvälitysreitteihin, kuten antioksidatiivisista/elektrofiilisista vaste-elementeistä (ARE) riippuviin reitteihin. Kolmas keskeinen tapahtuma on dendriittisolujen aktivoituminen, jota arvioidaan yleensä tiettyjen solujen pintamerkkiaineiden, kemokiinien ja sytokiinin, ilmenemisen perusteella. Neljäs keskeinen tapahtuma on T-solujen aktivoituminen ja proliferaatio, jota arvioidaan välillisesti hiirille tehdyllä paikallisella imusolmukemääritysmenetelmällä eli LLNA-kokeella (Local Lymph Node Assay) (3).

¹ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (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).

2. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 442E (2017). Siinä kuvataan *in vitro* -testejä, joilla tutkitaan mekanismeja, jotka on kuvattu ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeisen tapahtuman eli dendriittisolujen aktivoitumisen yhteydessä (2). Testimenetelmä koostuu testeistä, joita käytetään apuna ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessä YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti.

Tässä testimenetelmässä kuvatut testit ovat

- ihmisen solulinjaan perustuva aktivointitesti (h-CLAT, human Cell Line Activation Test)
 - U937-solulinjaan perustuva aktivointitesti (U-SENSTM)
 - interleukiini 8:n reportterigeenitesti (IL-8 Luc -testi).
3. Tähän testimenetelmään sisältyvissä testeissä ja niihin liittyvässä OECD:n testiohjeessa voi olla eroja tietojen tuottamiseen käytetyn menettelyn ja mitattujen lukemien osalta, mutta niitä voi käyttää ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeiseen tapahtumaan eli dendriittisolujen aktivoitumista koskeviin testituloksiin liittyvien maiden vaatimusten yhteydessä samalla, kun hyödynnetään OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

Taustaa ja keskeiseen tapahtumaan perustuvaan testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

4. Ihon herkistymisen arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnussonin ja Kligmanin GPMT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6) (4) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Hiirellä tehtävät testit, LLNA (TM B.42) (3) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta, LLNA: DA (TM B.50) (5) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.
5. Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testimenetelmät on katsottu tieteellisesti päteviksi menetelmiksi ihon herkistymisen haittavaikutusreitin ensimmäisen keskeisen tapahtuman (TM B.59; DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) (7)) ja toisen keskeisen tapahtuman (TM B.60; ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmä (8)) osalta ihon herkistymiseen liittyvän kemikaalien vaarallisuuden arvioinnissa.
6. Tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä joko kvantifioidaan muutosta solun pintamerkkiaineen (-aineiden) ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumiseen herkistävillä aineilla altistumisen jälkeen (esim. CD54,

CD86), tai muutoksia IL-8:n, dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvän sytokiinin, ilmentymisessä. Ihoa herkistävien aineiden on ilmoitettu indusoivan solukalvon merkkiaineiden (esim. CD40, CD54, CD80, CD83 ja CD86) ilmentymistä sen lisäksi, että ne indusoivat myös proinflammatorisia sytokiineja, kuten IL-1 β :aa ja TNF- α :aa, ja useita kemokiineja, kuten IL-8:aa (CXCL8) ja CCL3:a (9) (10) (11) (12), jotka liittyvät dendriittisolujen aktivoitumiseen (2).

7. Koska dendriittisolujen aktivoituminen on kuitenkin vain yksi keskeinen tapahtuma ihon herkistymisen hättävähäikutusreitissä (2) (13), niistä testeistä saatut tiedot, joissa mitataan pelkästään dendriittisolujen aktivoitumisen merkkiaineita, eivät välttämättä riitä siihen, että kemikaalien ihoa herkistävästä vaikutuksesta tai sen puuttumisesta voitaisiin tehdä päätelmiä. Siksi tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä tuotettuja tietoja suositellaan käytettäväksi tukevina tietoina ihoa herkistävien (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) ja herkistämättömien aineiden erottelussa testauksen ja arvioinnin yhdennettyjen lähestymistapojen (IATA) mukaisesti yhdistämällä ne muihin täydentäviin tietoihin. Ne voivat olla tietoja, jotka on saatu *in vitro* -testeillä, joissa tutkitaan ihon herkistymisen hättävähäikutusreitit muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista (13). Esimerkkejä näillä testeillä tuotettujen tietojen käytöstä määritettyjen lähestymistapojen (jotka on standardoitu sekä käytettävien tiedonlähteiden että ennusteiden johtamisessa tietoihin sovellettavien menettelyjen osalta) mukaisesti on julkaistu (13), ja niitä voidaan käyttää hyödyllisinä elementteinä IATA:n mukaisesti.
8. Tässä testimenetelmässä kuvattuja testejä ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokitteluun YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokkiin 1A ja 1B (ne viranomaiset, jotka käyttävät näitä kahta valinnaista alaluokkaa) eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Säätelykehyksen mukaan näillä menetelmillä saatuja positiivisia tuloksia voidaan kuitenkin käyttää yksinään kemikaalin luokittelussa YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.
9. Tässä testimenetelmässä käytetyllä ilmauksella ”testikemikaali” tarkoitetaan sitä, mitä testataan¹, eikä ilmaus liity siihen, voidaanko testejä käyttää yhdestä tai useammasta

¹ Kesäkuussa 2013 pidetyssä OECD:n yhteisessä kokouksessa sovittiin, että ilmausta ”testikemikaali” olisi käytettävä aina kun mahdollista aiempaa yhdenmukaisemmin uusissa ja päivitettävissä OECD:n testiohjeissa kuvaamaan sitä, mitä testataan.

ainesosasta koostuvien aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Testien käytettävyydestä useasta ainesosasta koostuvien aineiden/seosten testaamiseen on tällä hetkellä niukalti tietoa (14) (15). Teknisesti testejä voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi¹. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Lisäksi useasta ainesosasta koostuvia aineita tai seoksia testattaessa pitää ottaa huomioon sytotoksisten ainesosien mahdollinen häiritsevä vaikutus havaittuihin vasteisiin.

¹ Tätä virkettä ehdotettiin ja se hyväksyttiin kansallisten koordinaattorien työryhmän kokouksessa huhtikuussa 2014.

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Saatavana osoitteessa [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Tämän liitteen B.42 luku: Paikallinen imusolmukemäärittäminen. Tämän liitteen B.6 luku: Ihon herkistyminen.
- (4) Tämän liitteen B.50 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemäärittäminen. DA.
- (5) Tämän liitteen B.51 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemäärittäminen. BrdU-ELISA.
- (6) Tämän liitteen B.59 luku: In chemico -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay).
- (7) Tämän liitteen B.60 luku: *In vitro* -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmä.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841–7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031–8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390–8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

Lisäys 1

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IHMISEN SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (H-CLAT, HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST)

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. h-CLAT-testissä kvantifioidaan muutokset niiden solujen pintamerkkiaineiden ilmentymisessä, jotka liittyvät monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86 ja CD54), ihmisen monosyyttileukemiasolulinjassa THP-1 herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1) (2). Sen jälkeen solujen CD86- ja CD-54-pintamerkkiaineiden mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.
2. h-CLAT-testi on arvioitu Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) koordinoimassa validointitutkimuksessa ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki EURL ECVAMin tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (3), että h-CLAT-testiä käytetään IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten h-CLAT-testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. On osoitettu, että h-CLAT on siirrettävissä sellaisten laboratorioden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtausytometria-analyysistä. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioden sisäinen ja niiden välinen toistettavuus on 80 prosentin luokkaa (3) (12). Validointitutkimuksesta (13) ja muista julkaistuista tutkimuksista (14) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 85 prosenttia (N=142), herkkyys on 93 prosenttia (94/101) ja spesifisyys 66 prosenttia (27/41) (EURL ECVAMin tekemän uudelleenanalyysin (12) perusteella, kun otetaan huomioon kaikki olemassa oleva tiedot paitsi negatiiviset tulokset niistä kemikaaleista, joiden Log Kow -arvo on suurempi kuin 3,5 4 kohdassa kuvatun mukaisesti). h-CLAT-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (4) (13) (15). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot,

jotka koskevat h-CLAT-menetelmän käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (in vivo -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (3) (14) (15). h-CLAT-menetelmä soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faaseihin) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa (ks. 14 kohta). Testikemikaalit, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, antavat helposti vääriä negatiivisia tuloksia (14). Siksi niistä testikemikaaleista saatuja negatiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, ei tule ottaa huomioon. Sen sijaan näistä testikemikaaleista saatuja positiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, voidaan käyttää tukemaan testikemikaalin määrittämistä ihoa herkistäväksi aineeksi. Lisäksi käytetyn solulinjan rajallisen metaboloitokyvyn (16) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohaptienit (eli aineet, jotka vaativat entsyymistä aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien kautta) ja prehaptienit (eli aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa h-CLAT-testissä negatiivisia tuloksia varsinkin hapettumisvauhdin ollessa hidas (15). Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida h-CLAT-testillä (17), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometrista tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita tai propidiumjodidia käyttämällä. Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet (ks. 24 kohta) tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet (lisäys 1 ja 2). Edellä esitetyn perusteella negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten valossa ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn puitteissa. Jos voidaan osoittaa, ettei h-CLAT-menetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin.
5. Kuten edellä on todettu, h-CLAT-menetelmä auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin (4) (5) (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan

määrittää, miten h-CLAT-menetelmän tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.1.

TESTIN PERIAATE

7. hCLAT-menetelmä on in vitro -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen (CD86 ja CD54) ilmentymisen muutokset ihmisen monosyyttileukemian solulinjassa (THP-1-solut) 24 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. Nämä pintamolekyylit ovat tyypillisiä monosyyttisten THP-1-solujen aktivoitumisen merkkiaineita, ja ne voivat jäljitellä dendriittisolujen aktivoitumista, jolla on merkittävä tehtävä T-solujen virittymisessä (priming). Pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrillä sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluorokromilla leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus, jotta voidaan arvioida, tapahtuuko pintamerkkiaineiden ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. Pintamerkkiaineiden suhteellinen fluoresenssin intensiteetti liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 26 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 1.2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla. Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettava tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 20–22 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan h-CLAT-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 158 (18). Tätä protokollaa käytettiin EURL ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa. Suosituksena on käyttää tätä protokollaa, kun h-CLAT-menetelmä otetaan käyttöön ja kun sitä käytetään laboratoriossa. Jäljempänä kuvataan h-CLAT-menetelmän keskeiset osat ja menettelyt. Menetelmässä on kaksi vaihetta: *annoksenmäärittäystesti* ja *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen*.

Solujen valmistelu

10. h-CLAT-menetelmässä on käytettävä ihmisen monosyyttileukemiasoluista koostuvaa solulinjaa (THP-1). Solut (TIB-202™) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.
11. THP-1-soluja viljellään (olosuhteet: 37 °C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS), 0,05 mM 2-merkaptotaetania, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Penisilliinin ja streptomysiinin käyttö kasvatusliuoksessa voidaan välttää. Siinä tapauksessa käyttäjien on kuitenkin varmistettava, ettei antibioottien puuttuminen kasvatusliuoksesta vaikuta tuloksiin, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Jotta kontaminaation riski pidetään mahdollisimman pienenä, on noudatettava hyviä soluviljelykäytäntöjä riippumatta siitä, onko soluviljelyliuoksessa antibiootteja vai ei. THP-1-solut kylvetään tavallisesti 2–3 päivän välein tiheyteen $0,1\text{--}0,2 \times 10^6$ solua/ml. Niitä on ylläpidettävä tiheydellä $0,1\text{--}1,0 \times 10^6$ solua/ml. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivisia kontroleja, (2,4-dinitroklooribentseeni (DNCB) (CAS-nro 97-00-7, puhtaus ≥ 99 %) ja nikkelisulfaatti (NiSO₄) (CAS-nro 10101-97-0, puhtaus ≥ 99 %)) ja negatiivista kontrollia (maitohappo (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %)), kahden viikon kuluessa sulatuksesta. Sekä DNCB:n että NiSO₄:n pitäisi tuottaa positiivinen vaste sekä CD86- että CD54-pintamerkkiaineille, ja maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste niille kummallekin. Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Soluja voidaan kasvattaa enintään kaksi kuukautta sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 30. Reaktiivisuustesti on tehtävä 20–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.
12. Testausta varten THP-1-solujen kylvötiheyden on oltava joko $0,1 \times 10^6$ solua/ml tai $0,2 \times 10^6$ solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko 72 tai 48 tuntia. On tärkeää, että solujen tiheys on viljelypulloissa mahdollisimman tasainen heti esiviljelyn jälkeen jokaisessa kokeessa (käyttämällä jompaakumpaa edellä esitetyistä esiviljelyehdoista), koska solujen tiheys viljelypulloissa heti esiviljelyn jälkeen voi vaikuttaa allergeenien aiheuttamaan CD86:n/CD54:n ilmentymiseen (19). Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 2×10^6 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 24-kuoppaiselle tasapohjaiselle levyille (500 µl) (1×10^6 solua/kuoppa) tai 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levyille (80 µl) ($1,6 \times 10^5$ solua/kuoppa).

Annoksenmäärittäystesti

13. *Annoksenmäärittäystestillä* määritetään CV75-arvo eli se testikemikaalin pitoisuus, jolla solujen elinkyvyksi (CV, cell viability) saadaan 75 prosenttia verrattuna liuotin-/kantaja-ainekontrolliin. CV75-arvon avulla määritetään testikemikaalien pitoisuus CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittauksessa (ks. 20–24 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. h-CLAT-menetelmässä testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. myös 4 kohta) suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, $\geq$ puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene tai muodosta stabiilia dispersiota kahdessa ensin mainitussa liuottimessa/kantaja-aineessa. Lopulliset pitoisuudet ovat 100 mg/ml (suolaliuoksessa tai kasvatusliuoksessa) tai 500 mg/ml (DMSO:ssa). Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.
15. Laimentaminen on tehtävä seuraavien vaiheiden mukaisesti aloittamalla testikemikaalien varastoliuos pitoisuuksista 100 mg/ml (suolaliuos tai kasvatusliuos) tai 500 mg/ml (DMSO):
- Liuottimena/kantaja-aineena suolaliuos tai kasvatusliuos: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 50-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Jos levyn suurin loppupitoisuus 1 000 µg/ml ei ole toksinen, enimmäispitoisuus on määritettävä uudelleen tekemällä uusi sytotoksisuustesti. Levyn loppupitoisuus saa olla enintään 5 000 µg/ml suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen liuenneiden tai stabiilisti dispergoituneiden testikemikaalien yhteydessä.
 - Liuottimena/kantaja-aineena DMSO: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 250-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Levyn enimmäispitoisuus saa olla enintään 1 000 µg/ml, vaikka tämä pitoisuus ei olisi toksinen.
- Työliuoksia käytetään altistukseen siten, että levyllä olevaan THP-1-solususpensioon lisätään yhtä suuri tilavuus työliuosta (ks. myös 17 kohta), jotta saadaan vielä toinen kaksinkertainen laimennos (levyn loppupitoisuus vaihtelee yleensä välillä 7,81–1 000 µg/ml).
16. h-CLAT-menetelmässä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on kasvatusliuos (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. 4 kohta) joko kasvatusliuokseen tai suolaliuokseen) tai DMSO (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti DMSO:hon), ja levyllä testattava yksi loppupitoisuus on 0,2 prosenttia. Tälle kontrollille tehdään samat laimennokset kuin työliuoksille (ks. 15 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Kasvatusliuos tai työliuokset (ks. 15 ja 16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 24- tai 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitellyt levyt inkuboidaan $24 \pm 0,5$ tuntia 37°C :ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levy kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa (20).

Propidiumjodidi (PI) -värjäys

18. Altistuksen ($24 \pm 0,5$ h) jälkeen solut siirretään näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Supernatantit hävitetään ja loput solut resuspendoidaan 200 μl :lla (96-kuoppainen levy) tai 600 μl :lla (24-kuoppainen levy) fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, joka sisältää 0,1-prosentista naudan seerumin albumiinia (värjäyspuskuri). Solususpensiosta 200 μl siirretään 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levyille (96 kuopan osalta) tai mikroputkiin (24 kuopan osalta) ja pestään kahdesti 200 μl :lla (96 kuopan osalta) tai 600 μl :lla (24 kuopan osalta) värjäyspuskuriin. Lopuksi solut resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 μl) ja PI-liuosta lisätään (esim. 20 μl) (esimerkki: PI-liuoksen loppupitoisuus on 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisiniä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet.

Sytotoksisuuden mittaaminen virtausytometrialla ja CV75-arvon määrittäminen

19. Propidiumjodidin kertymä analysoidaan virtausytometrillä kanavalla FL-3. Yhteensä kerätään 10 000 elävää solua (PI-negatiivinen). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on pieni, on kerättävä enintään 30 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$\text{Solun elinkyky} = \frac{\text{Elävien solujen määrä}}{\text{Kerättyjen solujen kokonaismäärä}} \times 100$$

CV75-arvo (ks. 13 kohta), eli pitoisuus, jolla 75 prosenttia THP-1-soluista jää eloon (25 prosentin sytotoksisuus), lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttäen seuraavaa yhtälöä:

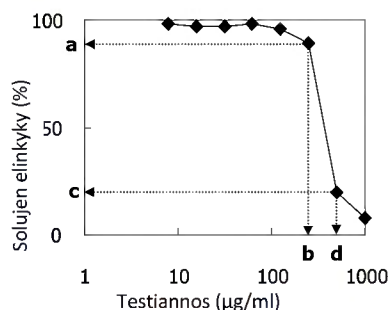
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Jossa:

a on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 75 prosenttia

c on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 75 prosenttia

b ja d ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot a ja c.



CV75-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

20. Testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti asianmukaiseen liuottimeen/kantaja-aineeseen (suolaliuos, kasvatusliuos tai DMSO; ks. 14 kohta). Testikemikaalit laimennetaan ensin pitoisuuteen, joka vastaa 100-kertaisesti (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 500-kertaisesti (DMSO:n osalta) $1,2 \times \text{CV75}$ -arvoa, joka on määritetty *annoksenmääritystestissä* (ks. 19 kohta). Jos CV75-arvoa ei voida määrittää (ts. jos *annoksenmääritystestissä* ei havaita riittävää sytotoksisuutta), alkupitoisuutena on käytettävä testikemikaalin suurinta liukoista tai stabiilisti dispergoitua pitoisuutta, joka on valmistettu kullakin liuottimella/kantaja-aineella. Levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Sen jälkeen tehdään 1,2-kertaiset sarjalaimennokset käyttämällä asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta, jotta saadaan varastoliuokset (kahdeksan pitoisuutta välillä $100 \times 1,2 \times \text{CV75} - 100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai välillä $500 \times 1,2 \times \text{CV75} - 500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (DMSO:n yhteydessä)), jotka testataan h-CLAT-menetelmällä (ks. esimerkki annosteluohjeesta DB-ALM-protokollasta nro 158). Seuraavaksi varastoliuokset laimennetaan vielä 50-kertaiseksi (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 250-kertaiseksi (DMSO:n yhteydessä) kasvatusliuokseen (työliuokset). Näitä työliuoksia käytetään altistuksessa, ja levyllä käytetään lopullista laimennuskerrointa, joka on 2. Jos tulokset eivät täytä kohdassa 29 ja 30 kuvattuja hyväksymisperusteita solujen elinkyvyn osalta, *annoksenmääritystesti* voidaan toistaa, jotta CV75-arvo voidaan määrittää tarkemmin. CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittauksessa voidaan käyttää vain 24-kuoppaisia levyjä.

21. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli valmistetaan 16 kohdassa kuvatulla tavalla. h-CLAT-menetelmässä käytettävä positiivinen kontrolli on DNCB (ks. 11 kohta), josta valmistetaan

varastoliuokset DMSO:ssa. Ne laimennetaan 20 kohdassa varastoliuosten osalta kuvatus mukaisesti. *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* DNCB:tä tulee käyttää positiivisena kontrollina yhtenä loppupitoisuutena levyllä (yleensä 4,0 µg/ml). Jotta DNCB:n pitoisuudeksi levyllä saadaan 4,0 µg/ml, valmistetaan varastoliuos, joka sisältää 2 mg/ml DNCB:tä DMSO:ssa, ja tämä liuos laimennetaan 250-kertaiseksi kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 8 µg/ml. Vaihtoehtoisesti positiivisen kontrollin pitoisuutena voidaan käyttää DNCB:n CV75-arvoa, joka määritetään jokaisessa testilaitoksessa. Myös muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailukelpoiset ajon hyväksymisperusteet. Positiivisten kontrollien osalta levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalille kuvatut (ks. 29 kohta), lukuun ottamatta viimeistä hyväksymisperustetta, sillä positiivinen kontrolli testataan yhtenä pitoisuutena.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

22. Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolliaineesta tarvitaan yksi koe, jotta saadaan ennuste. Jokainen koe koostuu vähintään kahdesta itsenäisestä ajosta, joissa mitataan *CD86:n/CD54:n ilmentymistä* (ks. 26–28 kohta). Kukin itsenäinen ajo tehdään eri päivänä tai samana päivänä, kunhan a) jokaiseen ajoon valmistetaan riippumattomat tuoreet varastoliuokset ja työliuokset testikemikaalista ja vasta-aineliuokset ja b) jokaisessa ajossa käytetään itsenäisiä kerättyjä soluja (ts. solut kerätään eri viljelypulloista), mutta solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrostuksesta. Testikemikaaleista ja kontrolliaineista valmistettuihin työliuoksiin (500 µl) sekoitetaan 500 µl suspendoituja soluja (1×10^6 solua) suhteessa 1:1, ja soluja inkuboidaan $24 \pm 0,5$ h, kuten 20 ja 21 kohdassa on selostettu. Jokaisessa ajossa riittää yksi rinnakkaisnäyte testikemikaalin ja kontrolliaineen kustakin pitoisuudesta, koska ennuste tehdään vähintään kahden itsenäisen ajon perusteella.

Solujen värjäys ja analyysi

23. Altistuksen ($24 \pm 0,5$ h) jälkeen solut siirretään 24-kuoppaiselta levyltä näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Sen jälkeen ne pestään kahdesti 1 ml:llä värjäyspuskuriä (tarvittaessa pesukertoja voidaan lisätä). Pesun jälkeen solut estetään 600 µl:lla estoliuosta (värjäyspuskuri, joka sisältää 0,01 prosenttia (w/v) globuliinia (Cohn-fraktio II, III, ihminen; SIGMA, nro G2388-10G tai vastaava)) ja inkuboidaan 4 °C:ssa 15 minuutin ajan. Estämisen jälkeen solut jaetaan kolmeen 180 µl:n alikvoottiin 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levyllä tai mikroputkeen.
24. Sentrifugoinnin jälkeen solut värjätään 50 µl:lla FITC-leimattua anti-CD86:ta, anti-CD54:ää tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. h-CLAT-

menetelmän DB-ALM-protokollassa nro 158 (18) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä laimentamalla ne suhteeseen 3:25 v/v (CD86 (BD-PharMingen, nro 555657; kloonit: Fun-1)) tai suhteeseen 3:50 v/v (CD54 (DAKO, nro F7143; kloonit: 6.5B5) ja IgG1 (DAKO, nro X0927)) värjäyspuskurilla. Testin kehittäjät ovat määrittäneet nämä vasta-aineiden laimennuskertoimet sellaisiksi, että ne tuottavat parhaan signaali-kohinasuhteen. Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaat käyttöpitoisuudet titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan tarvittaessa. Muita fluorokromilla leimattuja anti-CD86- ja/tai anti-CD54-vasta-aineita voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. On huomattava, että h-CLAT-menetelmän DB-ALM-protokollassa 158 (18) kuvatus kloonin tai vasta-aineen toimittajan vaihtaminen voi vaikuttaa tuloksiin. Kun solut on pesty vähintään kaksi kertaa 150 µl:lla värjäyspuskuria, ne resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 µl), ja siihen lisätään PI-liuosta (esim. 20 µl, jotta saadaan loppupitoisuus 0,625 µg/ml) tai muuta sytotoksisuuden merkkiaineliuosta (ks. 18 kohta). CD86:n ja CD54:n ilmentymistasot sekä solujen elinkyky analysoidaan virtausytometrin avulla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

25. CD86:n ja CD54:n ilmentyminen analysoidaan virtausytometrillä kanavalla FL-1. Fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon (MFI) perusteella lasketaan CD86:n ja CD54:n suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI) positiivisen kontrollin (ctrl) solujen ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen osalta seuraavalla yhtälöllä:

$$RFI = \frac{\text{kemikaalilla käsitellyn solun MFI} - \text{kemikaalilla käsitellyn isotooppikontrollisolujen MFI}}{\text{liuotin- tai kantaja-ainekäs. kontr.solujen MFI} - \text{liuotin- tai kantaja-ainekäs. isotooppikontr.sol.MFI}} \times 100$$

Myös solujen elinkyky - isotyypikontrollin (ctrl) soluista (jotka on värjätty hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla) lasketaan 19 kohdassa kuvatulla yhtälöllä.

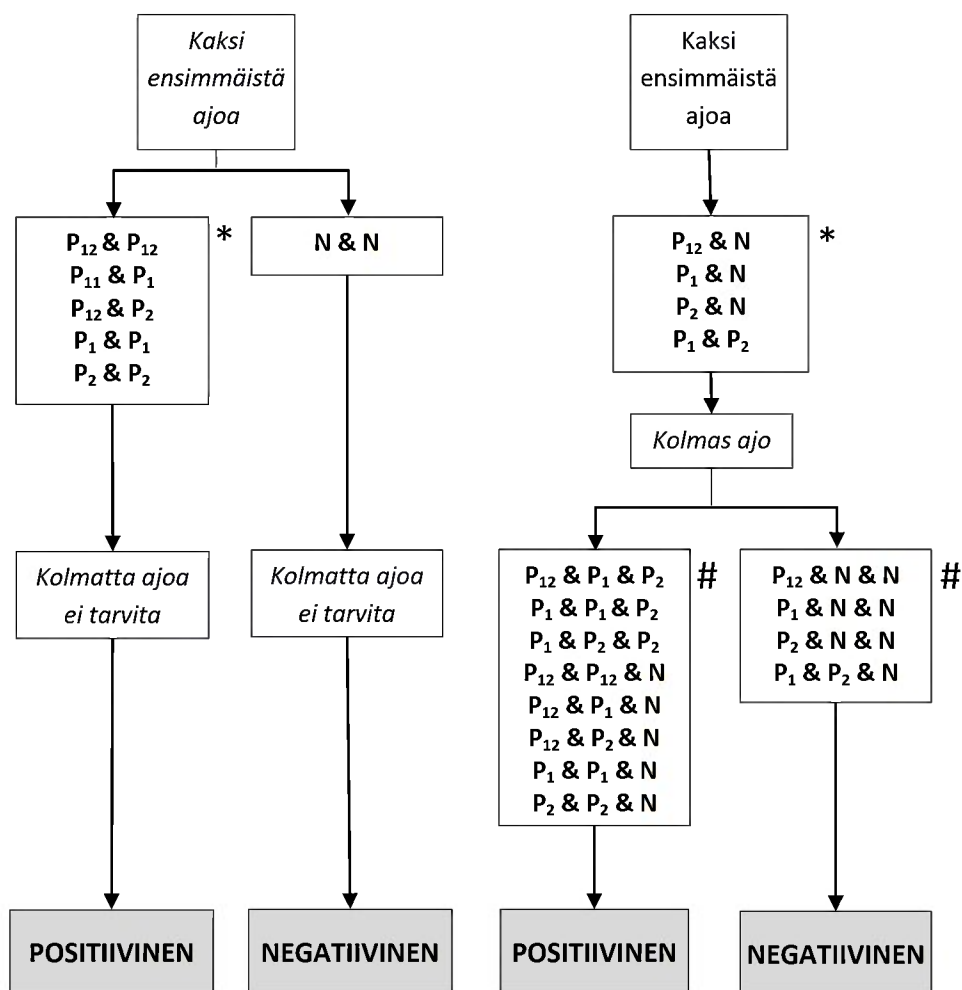
Ennustemalli

26. CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa, jotta saadaan yksi ennuste (POSITIIVINEN tai NEGATIIVINEN). h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään yksi seuraavista ehdoista täyttyy joko kummassakin kahdesta ajosta tai vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä ajosta. Muussa tapauksessa h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (kuviot 1):

- CD86:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).
- CD54:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 200 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).

27. Tämän perusteella on siis niin, että jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat kumpainenkin positiivisen tuloksen CD86:lle ja/tai CD54:lle, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä. Vastaavasti jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat negatiivisen tuloksen kummankin merkkiaineen osalta, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (30 kohdan määräykset asianmukaisesti huomioon ottaen) eikä kolmatta ajoa tarvita. Jos ensimmäiset kaksi ajoa eivät kuitenkaan ole johdonmukaisia vähintään jommankumman merkkiaineen osalta (CD54 tai CD86), on tehtävä kolmas ajo ja lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen itsenäisen ajon enemmistötulos (eli kaksi ajoa kolmesta). Tältä osin on todettava, että jos tehdään kaksi itsenäistä ajoa ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD86:lle (jäljempänä P_1) ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD54:lle (jäljempänä P_2), on tehtävä kolmas ajo. Jos kolmas ajo antaa negatiivisen tuloksen kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä N), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN. Toisaalta jos kolmas ajo antaa positiivisen tuloksen jommallekummalle merkkiaineelle (P_1 tai P_2) tai kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä P_{12}), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN.

Kuva 1: h-CLAT-menetelmässä käytetty ennustemalli. h-CLAT-ennustetta pitää tarkastella IATAn ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohtien määräysten valossa.



P₁: ajon tulos: vain CD86 positiivinen; P₂: ajon tulos: vain CD54 positiivinen; P₁₂: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 positiivinen; N: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 negatiivinen.

*Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät ensimmäisen kahden ajon tuloksista riippumatta järjestyksestä, jossa ne on voitu saada.

#Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella. Nämäkään eivät kuvasta sitä järjestystä, jossa ne on voitu saada.

28. Niille testikemikaaleille, joiden on ennustettu olevan POSITIIVISIA h-CLAT-menetelmällä, voidaan haluttaessa määrittää kaksi vaikuttavaa pitoisuutta (EC) (EC150-arvo CD86:lle ja EC200-arvo CD54:lle). Tämä on siis se pitoisuus, jolla testikemikaalit indusoivat RFI-arvon 150 tai 200. Näistä EC-arvoista voi olla apua myös

herkistyspotentiaalin (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa (4) (5) (6) (7) (8). Ne voidaan laskea seuraavilla yhtälöillä:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{pit} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{pit} - B_{pit})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{pit} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{pit} - B_{pit})]$$

jossa

A_{pit} on pienin pitoisuus yksikössä $\mu\text{g/ml}$, kun $\text{RFI} > 150$ (CD86) tai 200 (CD54)

B_{pit} on suurin pitoisuus yksikössä $\mu\text{g/ml}$, kun $\text{RFI} < 150$ (CD86) tai 200 (CD54)

A_{RFI} on RFI pienimmällä pitoisuudella, kun $\text{RFI} > 150$ (CD86) tai 200 (CD54)

B_{RFI} on RFI suurimmalla pitoisuudella, kun $\text{RFI} < 150$ (CD86) tai 200 (CD54)

Jos halutaan tarkemmat EC150- ja EC200-arvot, *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* voidaan tarvita kolme itsenäistä ajoa. Lopulliset EC150- ja EC200-arvot määritetään kolmesta itsenäisestä ajosta laskettujen EC-arvon mediaaniksi. Jos vain kaksi kolmesta itsenäisestä ajosta täyttää positiivisen tuloksen kriteerit (ks. 26 ja 27 kohta), kahdesta lasketusta EC150- tai EC200-arvoista hyväksytään suurempi arvo.

Hyväksymisperusteet

29. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täyttyävä h-CLAT-menetelmää käytettäessä (22) (27).

- Kasvatusliuos- ja liuotin-/kantaja-ainekontrollien solujen elinkyvyn pitää olla suurempi kuin 90 prosenttia.
- Liuotin-/kantaja-ainekontrollissa sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvot eivät saa ylittää positiivisen tuloksen kriteerejä (CD86:n $\text{RFI} \geq 150 \%$ ja CD54:n $\text{RFI} \geq 200 \%$). Liuotin-/kantaja-ainekontrollin RFI-arvot lasketaan käyttämällä 25 kohdassa kuvattua yhtälöä ("kemikaalin MFI" on korvattava "liuottimen/kantaja-aineen MFI:llä" ja "liuottimen/kantaja-aineen MFI" on korvattava "(kasvatusliuos)kontrollin MFI:llä").
- Sekä kasvatusliuos- että liuotin-/kantaja-ainekontrolleissa CD86:n ja CD54:n MFI:n suhteessa isotyypikontrolliin on oltava $> 105 \%$.
- Positiivisessa kontrollissa (DNCB) sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvojen on täytettävä positiivisen tuloksen kriteerit (CD86:n $\text{RFI} \geq 150$ ja CD54:n $\text{RFI} \geq 200$), ja solujen elinkyvyn on oltava yli 50 %.
- Testikemikaalin osalta solujen elinkyvyn on oltava yli 50 prosenttia vähintään neljässä testatusta pitoisuudesta jokaisessa ajossa.

30. Negatiiviset tulokset hyväksytään vain sellaisista testikemikaaleista, joiden yhteydessä solujen elinkyky on alle 90 prosenttia suurimmalla testatulla pitoisuudella (ts. $1,2 \times CV75$ 20 kohdassa kuvatun sarjalaimennoksen mukaisesti). Jos solujen elinkyky on kaavalla $1,2 \times CV75$ yhtä kuin tai suurempi kuin 90 prosenttia, negatiivinen tulos on hylättävä. Tässä tapauksessa on suositeltavaa yrittää täsmentää annoksen valintaa toistamalla CV75-määrittäminen. On kuitenkin muistettava, että kun testikemikaalin enimmäispitoisuutena testissä käytetään pitoisuutta 5 000 µg/ml suolaliuoksessa (tai kasvatusliuoksessa tai muissa liuottimissa/kantaja-aineissa), pitoisuutta 1 000 µg/ml DMSO:ssa tai suurinta liukoista pitoisuutta, negatiivinen tulos on hyväksyttävä, vaikka solujen elinkyky on yli 90 prosenttia.

Testiraportti

31. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, Log Kow, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset

- mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

- molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, Log K_{ow} , vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

- tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja
- kuvaus käytetystä testistä
- käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)
- käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot globuliinista, vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineista, joita testissä käytettiin
- menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

- solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut MFI- ja RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyyalueisiin
- solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyyalueisiin
- solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

Testimenettely

- tehtyjen ajojen lukumäärä
- testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)
- altistuksen kesto (jos se poikkeaa suosituksesta)
- kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä
- kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

- tietojen taulukointi: CV75 (tarvittaessa), yksittäiset geometriset MFI-, RFI- ja solujen elinkykyarvot, EC150/EC200-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella
- tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

- h-CLAt-menetelmällä saatujen tulosten tarkastelu

- testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428–437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Saatavana osoitteessa <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318–1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333–1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489–504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371–379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337–351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355–2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Saatavana osoitteessa <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Saatavana osoitteessa <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599–609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683–1969.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. Saatavana osoitteessa <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70–82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Saatavana osoitteessa [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

Lisäys 1.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (22).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV75: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 75 prosenttia.

EC150: Pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen RFI-arvo on 150.

EC200: Pitoisuudet, joilla CD54:n ilmentymisen RFI-arvo on 200.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment), yhdenmety lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin: Jäsennetty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Kasvatusliuoskontrolli: Käsittelemätön rinnakkaisnäyte, joka sisältää kaikki testijärjestelmän osat. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, vaikuttaako liuotin/kantaja-aine testijärjestelmään.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

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

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI): Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella/kantaja-aineella käsiteltyjen solujen MFI-arvoon.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (21).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käyttäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (21).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokiteltavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 0,1 prosenttia naudan seerumin albumiinia.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (myös työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (23).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (21).

Lisäys 1.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen h-CLAT-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitettulle aineelle ja saamalla CV75-, EC150- ja EC200-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro*-vertailutietoja, jotka on tuotettu h-CLAT-menetelmällä. Myös h-CLAT-menetelmästä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (3) (14).

Taulukko 1: Suositellut aineet h-CLAT-menetelmää koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	<i>In vivo</i> -ennuste ¹	CV75-viitealue yksikössä µg/ml ²	h-CLAT-tulokset CD86:n osalta (EC150-viitealue yksikössä µg/ml) ²	h-CLAT-tulokset CD54:n osalta (EC200-viitealue yksikössä µg/ml) ²
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	2–12	Positiivinen (0,5–10)	Positiivinen 0,5–15
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	5–95	Positiivinen (<40)	Negatiivinen (>1,5) ³
Nikkelisulfaatti	10101-97-0	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–500	Positiivinen (<100)	Positiivinen (10–100)
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–400	Negatiivinen (>10) ³	Positiivinen (10–140)
R(+)-limoneeni	5989-27-5	Neste	Herkistävä (heikko)	>20	Negatiivinen (>5) ³	Positiivinen (<250)
Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	25–100	Positiivinen (20–90)	Positiivinen (20–75)
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	1 500–5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
4-aminobentsoehappo	150-13-0	Kiinteä	Herkistämätön	>1 000	Negatiivinen (>1 000)	Negatiivinen (>1 000)

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

¹ *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (3) (14). *In vivo* -vaikutuskyky johdetaan ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (24).

² Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (13) (25).

³ Aikaisemmin suurin osa negatiivista tuloksista on saatu tälle merkkiaineelle, ja sen takia negatiivinen tulos on odotuksenmukaisin. Esitetty alue määriteltiin muutaman aikaisemmin saadun positiivisen tuloksen perusteella. Jos saadaan

positiivinen tulos, EC-arvon on oltava ilmoitetulla viitealueella.

Lisäys 2

***IN VITRO* -IHOHERKISTYS: U937-SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (U-SENS™)**

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. U-SENS™-testissä kvantifioidaan muutokset sellaisen solun pintamerkkiaineen ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86), ihmisen histiosyyttisessä lymfoomasolulinjassa U937 herkistävillä aineilla altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen solulinjassa U937 CD86-pintamerkkiaineen mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.
2. U-SENS™-testi on arvioitu L'Orealin koordinoimassa validointitutkimuksessa (2) ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) (3). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (4), että U-SENS™-testiä käytetään IATAN osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Ohjeasiakirjassaan, joka koskee ihon herkistymiseen liittyvien IATAN osana käytettyjen tietojen integrointia ja yksittäisiä tiedonlähteitä koskevien jäsenneltyjen lähestymistapojen raportointia, OECD käsittelee lukuisia tapausselostuksia, joissa kuvataan erilaisia testausstrategioita ja ennustemalleja. Yksi erilaisista määritetyistä lähestymistavoista on U-SENS-testi (5). Esimerkkejä U-SENS™-testillä saatujen tietojen käytöstä muiden tietojen, myös aikaisempien tietojen ja olemassa olevien validien ihmistä koskevien tietojen (6) kanssa, on raportoitu myös muualla kirjallisuudessa (4) (5) (7).
3. On osoitettu, että U-SENS™-testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtausmittometria-analyysistä. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioden sisäinen toistettavuus on 90 prosentin ja laboratorioden välinen toistettavuus on 84 prosentin luokkaa (8). Validointitutkimuksesta (8) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 86 prosenttia (N=166), herkkyys on 91 prosenttia (118/129) ja spesifisyys 65 prosenttia (24/37). Ihmisiä koskeviin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 77 prosenttia (N=101), herkkyys on 100 prosenttia (58/58) ja spesifisyys 47 prosenttia (20/43). LLNA-testiin verrattuna U-

SENSTM-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (1) (8) (9). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että U-SENSTM-testiä voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat U-SENSTM-testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavilla olevien tietojen perusteella U-SENSTM-testin osoitettiin olevan sovellettavissa testikemikaaleihin (myös kosmetiikan ainesosiin, kuten säilöntäaineisiin, pinta-aktiivisiin aineisiin, vaikuttaviin aineisiin ja väriaineisiin), jotka kattavat useita orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, ihoherkistyspotentiaaleja (*in vivo* -tutkimuksissa määritetyn mukaisesti) ja monenlaisia reaktiomekanismia, joiden tiedetään liittyvän ihon herkistymiseen (kuten Michael-akseptorit, Schiffin emäksen muodostuminen, asyylin siirtoaine, bimolekulaarinen nukleofiilinen substituoitu [SN2] tai nukleofiilinen aromaattinen substituoitu [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENSTM-testi soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faaseihin) asianmukaisessa liuotuksessa/kantaja-aineessa (ks. 13 kohta). U-SENSTM-testillä ennustettiin oikein kemikaalit, jotka määritettiin aineistossa prehapteeneiksi (aineiksi, jotka hapetus aktivoi) tai prohapteeneiksi (aineiksi, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien välityksellä) (1) (10). Kalvojen toimintaa häiritsevät aineet voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia CD86:n epäspesifisen ilmentymisen lisääntymisen vuoksi, sillä kolme seitsemästä väärästä positiivisesta tuloksesta *in vivo* -vertailuokituksessa oli pinta-aktiivisia aineita (1). Sen vuoksi pinta-aktiivisia aineita koskeviin positiivisiin tuloksiin on syytä suhtautua varauksellisesti, kun taas niitä koskevia negatiivisia tuloksia voidaan käyttää tukena testikemikaalin määrittämisessä herkistämättömäksi aineeksi. Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida U-SENSTM-testillä (1), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometrista tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita (mahdolliset väärät negatiiviset tulokset) tai propidiumjodidia käyttämällä (solujen elinkyky ei mitattavissa). Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden

osoittamiseen tarkoitetut aineet (lisäys 2.2). Edellä esitetyn perusteella pinta-aktiivisia aineita koskevia positiivisia tuloksia ja voimakkaasti fluoresoivia testikemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn mukaisesti. Jos voidaan osoittaa, ettei U-SENS™-testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

5. Kuten edellä on todettu, U-SENS™-testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten U-SENS™-testillä saatuja tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.
6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 2.1.

TESTIN PERIAATE

7. U-SENS™-testi on *in vitro* -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen CD86 ilmentymisen muutokset ihmisen histiosyyttisessä lymfoomasolulinjassa (U937-solut) 45±3 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. CD86-pintamerkkiaine on yksi tyypillinen U937-solujen aktivoitumisen merkkiaine. CD86:n tiedetään olevan stimuloiva molekyyli, joka voi jäljitellä monosyyttien aktivoitumista, millä on tärkeä tehtävä T-solujen erilaistumisessa. Solujen CD86-pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrillä sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluoresensiisotiosyanaatilla (FITC) leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus (käyttämällä esimerkiksi propidiumjodidia), jotta voidaan arvioida, tapahtuuko CD86-pintamerkkiaineen ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. CD86-pintamerkkiaineen stimulaatioindeksi (S.I.) liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 19 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2.2 lueteltujen kymmenen pätevyiden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (11). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettava tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 15 ja 16 kohta) saadut aiemmat

tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan U-SENSTM-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 183 (12). Vakiomenettelyjä (Standard Operating Procedures, SOP) pitää käyttää, kun laboratorio ottaa U-SENSTM-testin käyttöön ja käyttää sitä. U-SENSTM-testin tekemisessä voidaan käyttää automatisoitua järjestelmää, jos voidaan osoittaa, että se antaa samanlaiset tulokset, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 mainitut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Seuraavassa kuvataan U-SENSTM-testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

10. U-SENSTM-testissä on käytettävä ihmisen histiosyyttisistä lymfoomasoluista koostuvaa solulinjaa U937 (13). Solut (klooni CRL1593.2) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.
11. U937-soluja viljellään (olosuhteet: 37 °C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 prosenttia vasikkasikiön seerumia (FCS:ää), 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (valmis kasvatusliuos). U937-solut siirrostetaan rutiininomaisesti 2–3 päivän välein tiheyteen 1,5 tai 3×10^5 solua/ml. Solutiheys saa olla enintään 2×10^6 solua/ml, ja solujen elinkyvyn, joka mitataan trypaanisinisellä väriin perustuvalla poissulkemisella, tulee olla ≥ 90 prosenttia (tätä ei kuitenkaan sovelleta ensimmäiseen sulatuksen jälkeiseen siirrostukseen). Ennen testauksessa käyttämistä jokaisen solu-, FCS- tai vasta-aine-erän laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivista kontrollia eli pikryylisulfonihappoa (2,4,6-trinitrobensoeni-sulfonihappo: TNBS) (CAS-nro 2508-19-2, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia eli maitohappoa (LA) (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %), vähintään viikon kuluttua sulatuksesta. Reaktiivisuustestissä on testattava kuusi loppupitoisuutta kummastakin kahdesta kontrollista (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75 ja 100 µg/ml; maitohappo: 1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml). Valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen TNBS:n pitäisi tuottaa positiivinen ja pitoisuuteen liittyvä vaste CD86:sta (ts. kun positiivista pitoisuutta, CD86 S.I. ≥ 150 , seuraa pitoisuus, jossa CD86 S.I. suurenee), ja valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste CD86:sta (ks. 21 kohta). Testissä saa käyttää vain sellaista soluerää, joka läpäisi reaktiivisuustestin kaksi kertaa. Soluja voidaan kasvattaa enintään seitsemän viikkoa sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 21. Reaktiivisuustesti on tehtävä 18–22 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

12. Testausta varten U937-solujen kylvötiheyden on oltava joko 3×10^5 solua/ml tai 6×10^5 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko kaksi päivää tai yksi päivä. Muita kuin edellä kuvattuja esiviljelyolosuhteita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut ja jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 5×10^5 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levyille (100 µl) (lopullinen solutiheys $0,5 \times 10^5$ solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

13. Liukoisuus arvioidaan ennen testausta. Sitä varten testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti pitoisuudella 50 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotinvaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, $\geq$, puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene valmiista kasvatusliuoksesta koostuvaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Testauksessa testikemikaali liuotetaan loppupitoisuuteen 0,4 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen, jos kemikaali liukenee tähän liuottimeen/kantaja-aineeseen. Jos kemikaali liukenee ainoastaan DMSO:hon, kemikaali liuotetaan pitoisuudella 50 mg/ml. Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.
14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. Koska annoksenmäärittäystä ei tehdä, ensimmäisessä ajossa tulee testata kuusi loppupitoisuutta (1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa, joka on joko valmis kasvatusliuos tai 0,4-prosenttinen DMSO-liuos. Seuraaviin ajoihin testikemikaaliliuoksista valmistetaan vähintään neljä työliuosta (ts. vähintään neljä pitoisuutta) käyttämällä kyseistä liuotinta/kantaja-ainetta ja aloittamalla 0,4 mg/ml -pitoisuudesta valmiissa kasvatusliuoksessa tai 50 mg/ml -pitoisuudesta DMSO:ssa. Työliuoksia käytetään käsittelyssä siten, että levyllä olevan työliuoksen tilavuuteen lisätään yhtä suuri tilavuus U937-solususpensiota (ks. 11 kohta edellä), jotta saadaan toinen kaksinkertainen laimennos (12). Mahdollisten seuraavien ajojen pitoisuudet (joita on oltava vähintään neljä) valitaan kaikkien aiempien ajojen yksittäisten tulosten perusteella (8). Käyttökelpoiset loppupitoisuudet ovat 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ja 200 µg/ml. Suurin loppupitoisuus on 200 µg/ml. Jos CD86:sta saadaan positiivinen arvo pitoisuudella 1 µg/ml, sen jälkeen testataan pitoisuus 0,1 µg/ml, jotta löydetään se pitoisuus testikemikaalista, jolla CD86:n arvo ei ylitä positiivisen tuloksen rajaa. Jokaisesta ajosta lasketaan EC150-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa CD86:n osalta positiivisen rajan, joka on 150 prosenttia, ks. 19 kohta),

jos CD86:sta havaitaan positiivinen pitoisuus-vaste. Jos testikemikaalin aiheuttama CD86:n positiivinen vaste ei liity pitoisuuteen, EC150-arvon laskeminen ei välttämättä ole oleellista, kuten U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 on kuvattu (12). Jokaisesta ajosta lasketaan CV70-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa sytotoksisuusrajan eli 70 prosenttia, ks. 19 kohta), mikäli mahdollista (12). Jotta voidaan tutkia CD86-arvon suurenemisen pitoisuus-vastevaikutus, kaikki pitoisuudet käyttökelpoisista pitoisuuksista on valittava tasaisesti EC150-arvon (tai CD86:n osalta suurimman negatiivisen ei-sytotoksisen pitoisuuden) ja CV70-arvon (tai suurimman sallitun pitoisuuden eli 200 µg/ml:n) väliltä. Yhdessä ajossa on testattava vähintään neljä pitoisuutta, joista ainakin kahden on oltava samoja kuin aiemmassa ajossa (aiemmissa ajoissa), jotta niitä voidaan vertailla.

15. U-SENS™-testissä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on valmis kasvatusliuos (liukenevat tai stabiilisti dispergoituvat testikemikaalit) (ks. 4 kohta) tai 0,4-prosenttinen DMSO valmiissa kasvatusliuoksessa (testikemikaalit, jotka liukenevat tai dispergoituvat stabiilisti DMSO:hon).
16. U-SENS™-testissä käytettävä positiivinen kontrolli on valmiiseen kasvatusliuokseen valmistettu TNBS (ks. 11 kohta). TNBS:ää on käytettävä positiivisena kontrollina CD86:n ilmentymisen mittaamisessa lopullisena pitoisuutena levyllä (50 µg/ml), ja sillä solujen elinkyvyn tulisi olla > 70 prosenttia. Jotta TNBS:n pitoisuudeksi levyllä saadaan 50 µg/ml, valmistetaan 1 M:n (ts. 293 mg/ml) varastoliuos TNBS:ää valmiissa kasvatusliuoksessa, ja tämä liuos laimennetaan 2930-kertaiseksi valmiilla kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 100 µg/ml. Negatiivisena kontrollina on käytettävä maitohappoa (LA, CAS-nro 50-21-5) pitoisuudella 200 µg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen liotettuna (0,4 mg/ml:n varastoliuoksesta). Jokaiselle levyllä valmistetaan jokaisessa ajossa kolme rinnakkaisnäytettä kasvatusliuoksesta, joka toimii käsittelemättömänä kontrollina, liuotin-/kantaja-ainekontrollista sekä negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista (12). Muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet. Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalin perusteet (ks. 12 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli tai työliuokset (ks. 14–16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitelty levyt inkuboidaan 45±3 tuntia 37 °C:ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Ennen inkubointia levyt peitetään puoliläpäisevällä kalvolla, jotta vältetään haihtuvien testikemikaalien höyrystyminen ja testikemikaaleilla käsiteltyjen solujen ristikontaminaatio (12).

Solujen värjäys

18. Altistuksen (45 ± 3 h) jälkeen solut siirretään V:n muotoiselle mikrotiitterilevyllä ja kerätään sentrifugoimalla. Liukoisuuden häiriöt määritellään mikroskoopilla havaittavina kiteinä tai pisaroina 45 ± 3 tuntia käsittelyn jälkeen (ennen solujen värjäystä). Supernatantit hävitetään ja jäljellä olevat solut pestään kerran 100 µl:lla jääkylmää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS:ää), joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia (värjäyspuskuria). Sentrifugoinnin jälkeen solut resuspendoidaan 100 µl:lla värjäyspuskuria ja värjätään 5 µl:lla (ts. 0,25 µg) FITC-leimattua anti-CD86:ta tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4 °C:ssa 30 minuutin ajan valolta suojattuna. U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 (12) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä (CD86: BD-PharMingen nro 555657, klooni: Fun-1, tai Caltag/Invitrogen nro MHCD8601, klooni: BU63; ja IgG1: BD-PharMingen nro 555748 tai Caltag/Invitrogen nro GM4992). Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Testissä voidaan käyttää muita klooneja tai sellaisten vasta-aineiden tuottajia, jotka ovat läpäisseet reaktiivisuustestin (ks. 11 kohta). Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaan käyttöpitoisuuden titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan. Muita havaintojärjestelmiä, kuten fluorokromilla leimattuja anti-CD86-vasta-aineita, voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet. Sen jälkeen, kun solut on pesty kahdesti 100 µl:lla värjäyspuskuria ja kerran 100 µl:lla jääkylmää PBS:ää, ne resuspendoidaan jääkylmällä PBS:llä (125 µl näytteille, jotka analysoidaan manuaalisesti putki kerrallaan, tai 50 µl, jos käytetään automaattista näytelevyä), ja siihen lisätään PI-liuosta (loppupitoisuus 3 µg/ml). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisiniä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet.

Virtaussytometria-analyysi

19. CD86:n ilmentymistaso ja solujen elinkyky analysoidaan virtaussytometrin avulla. Solut näkyvät kokoa (FSC) ja granulaarisuutta (SSC) ilmaisevina pistekaavioina (logaritminen asteikko), joiden avulla voidaan selvästi tunnistaa populaatio ensimmäisellä portilla (R1) ja eliminoida solujäte. Tavoitteena on saada yhteensä 10 000 solua porttiin R1 jokaisesta kuopasta. Saman R1-portin solut näytetään FL3- tai FL4-/SSC-pistekaaviona. Elinkykyiset solut rajataan toisella portilla (R2), jolla valitaan propidiumjodidin osalta negatiivisten solujen populaatio (FL3- tai FL4-kanava). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on heikko, voidaan kerätä

enintään 20 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$\text{Solujen elinkyky} = \frac{\text{Elävien solujen määrä}}{\text{Kerättyjen solujen kokonaismäärä}} \times 100$$

FL-1-positiivisten solujen prosentuaalinen osuus mitataan sen jälkeen näistä elinkykyisistä soluista R2-portilla (R1-portin sisällä). CD86:n ilmentyminen solujen pinnalla analysoidaan FL1-/SSC-pistekaaviolla, joka koskee portilla elinkykyisiä soluja (R2).

Kasvatusliuos-/IgG1-kuoppien osalta analyysin markkeri asetetaan lähelle pääpopulaatiota, jolloin kasvatusliuoskontrollien IgG1-arvon kohdealue on 0,6–0,9 prosenttia.

Väri-interferenssi määritetään FITC-leimatus IgG1-pistekaavion muutokseksi (IgG1 FL1:n geometrinen keskiarvo S.I. ≥ 150 %).

Kontrollisolujen (käsitlemättömät tai 0,4-prosenttinen DMSO) ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen CD86:n stimulaatioindeksi (S.I.) lasketaan seuraavalla yhtälöllä:

$$S. I. = \frac{CD86^{+}\text{-käsiteltyt solut \%} - IgG1^{+}\text{-käsiteltyt solut \%}}{CD86^{+}\text{ kontrollisolut \%} - IgG1^{+}\text{ kontrollisolut \%}} \times 100$$

Käsitlemättömien IgG1⁺-kontrollisolujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan analyysimarkkerilla määritettyjen FL1-positiivisten IgG1-solujen prosenttiosuutta (hyväksyttävä alue on välillä $\geq 0,6$ ja $< 1,5$ prosenttia, ks. 22 kohta) elinkykyisistä käsitlemättömistä soluista.

IgG1⁺/CD86⁺-kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan FL1-positiivisten IgG1-/CD86-solujen prosenttiosuutta, joka mitataan liikuttamatta analyysimarkkeria elinkykyisten kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen seassa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

20. U-SENSTM-testissä lasketaan seuraavat parametrit: CV70-arvo (pitoisuus, joka osoittaa, että U937-soluista 70 prosenttia on elossa (sytotoksisuus 30 %)) ja EC150arvo (pitoisuus, jolla testikemikaalit ovat indusoineet CD86:n stimulaatioindeksiksi (S.I.) 150 prosenttia.

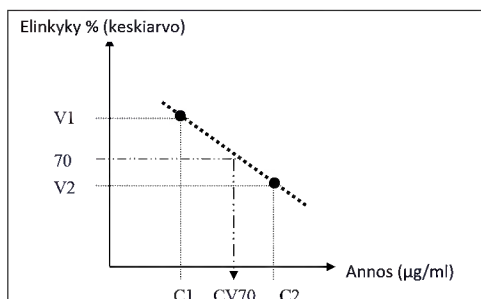
CV70 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Jossa:

V1 on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 70 prosenttia

V2 on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 70 prosenttia
C1 ja C2 ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot V1 ja V2.



CV70-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

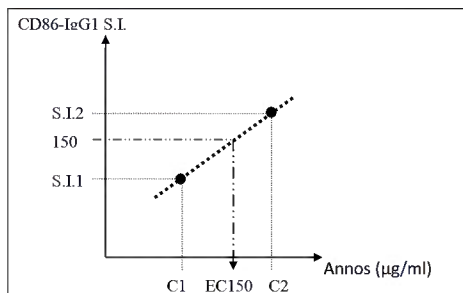
EC150 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Jossa:

C1 on suurin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 on pienin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I. ≥ 150 % (S.I. 2).



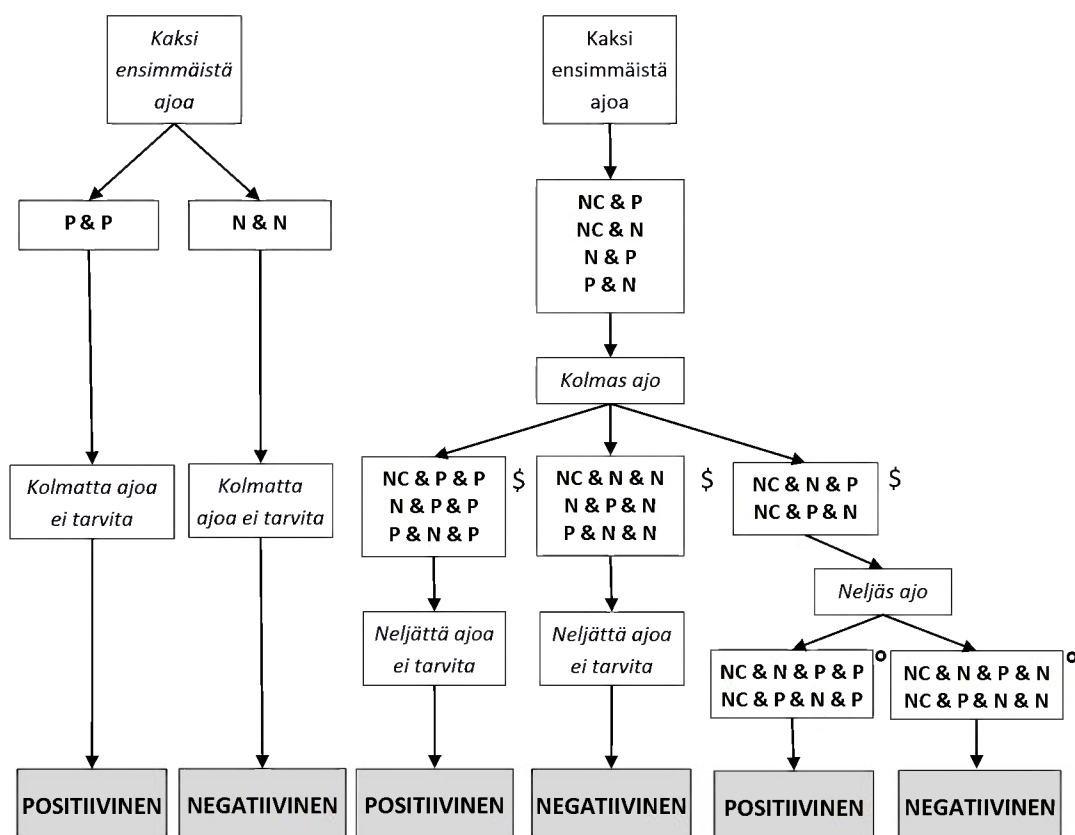
EC150- ja CV70-arvot lasketaan

- jokaisesta testiajosta: yksittäisiä EC150- ja CV70-arvoja käytetään työkaluina tutkittaessa CD86:n ilmentymisen lisääntymisen pitoisuus-vastevaikutusta (ks. 14 kohta)
- CV70-kokonaisarvo määritetään keskimääräisen elinkyvyn perusteella (12)
- EC150-kokonaisarvo määritetään CD86-arvojen keskimääräisen stimulaatioindeksin perusteella siitä testikemikaalista, joka U-SENSTM-testissä määritetään POSITIIVISEKSI (ks. 21 kohta) (12).

Ennustemalli

21. CD86:n ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään neljänä pitoisuutena ja vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa (jotka tehdään eri päivinä), jotta saadaan yksi ennuste (NEGATIIVINEN tai POSITIIVINEN).
- U-SENSTM-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään negatiivisena (jäljempänä N), jos CD86:n stimulaatioindeksi on alle 150 prosenttia kaikilla ei-sytotoksisilla pitoisuuksilla (solujen elinkyky $\geq 70\%$) ja jos interferenssiä ei havaita (sytotoksisuus, liukoisuus: ks. 18 kohta, tai väri: ks. 19 kohta, riippumatta niistä ei-sytotoksisista pitoisuuksista, joilla interferenssiä havaitaan). Kaikissa muissa tapauksissa: U-SENSTM-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään positiivisena (jäljempänä P), jos CD86:n stimulaatioindeksi on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia ja/tai interferenssiä on havaittu.
 - U-SENSTM-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat negatiivisia (N) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin negatiivisia (N), U-SENSTM-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.
 - U-SENSTM-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat positiivisia (P) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin positiivisia (P), U-SENSTM-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.
 - Koska annoksenmäärittystestiä ei tehdä, poikkeus on se, jos CD86:n stimulaatioindeksi on ensimmäisessä ajossa yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella. Tällöin testiajon katsotaan olevan EPÄSELVÄ (ES), ja lisätestiajoissa on testattava lisää pitoisuuksia (suurimman ei-sytotoksisen pitoisuuden ja pienimmän sytotoksisen pitoisuuden väliltä, ks. 20 kohta). Jos testiajon tulos on epäselvä, on tehtävä vähintään kaksi lisätestiajoa. Jos toisen ja kolmannen ajon tulokset ovat epäyhtenäiset (N ja/tai P riippumattomasti), on tehtävä vielä neljäs ajo (kuva 1). Näiden seuranta-ajojen katsotaan olevan positiivisia, jos vain yhdellä ei-sytotoksisella pitoisuudella CD86-arvoksi saadaan yhtä kuin tai enemmän kuin 150 prosenttia, koska pitoisuuden määrittämistä on mukautettu tietyille testikemikaalille. Lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen tai neljän itsenäisen testiajon enemmistötulos (ts. kaksi kolmesta tai kaksi neljästä) (kuva 1).

Kuva 1: U-SENSTM-testissä käytetty ennustemalli. U-SENSTM-ennustetta pitää tarkastella IATA:n sekä 4 kohdan ja yleisjohtannon kohtien 7, 8 ja 9 määräysten valossa.



N: Testiajo, jossa ei ole havaittu CD86:n positiivisuutta tai interferenssiä.

P: Testiajo, jossa on havaittu CD86:n positiivisuutta ja/tai interferenssiä (interferenssejä).

ES: Epäselvä. Ensimmäisen ajon tulos on epäselvä, kun CD86 on positiivinen vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella.

#: Vain ensimmäiseen ajoon liittyvä yksittäinen epäselvä päätelmä johtaa automaattisesti siihen, että on tehtävä kolmas ajo, jotta saadaan aikaan enemmistö positiivisista (P) tai negatiivisista (N) päätelmistä vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä päätöksestä.

\$: Laatikossa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

°: Laatikossa näytetään asianmukaiset yhdistelmät neljän ajon tuloksista ensimmäisestä kolmesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

Hyväksymisperusteet

22. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täyttyvä U-SENSTM-testiä käytettäessä (12).

- Altistusajan (45±3 h) päättyessä käsittelemättömien U937-solujen keskimääräinen elinkyky kolmessa rinnakkaisnäytteessä on oltava > 90 prosenttia, eikä CD86:n

ilmentymisessä saa näkyä muutosta. Käsittlemättömien U937-solujen CD86:n perusilmentymisen on oltava välillä ≥ 2 ja ≤ 25 prosenttia.

- Jos liuottimena käytetään DMSO:ta, DMSO-kantaja-ainekontrollin validiteetti arvioidaan laskemalla DMSO:lla aikaansaatu stimulaatioindeksi verrattuna käsittelemättömiin soluihin, ja kolmen rinnakkaisnäytteen solujen keskimääräisen elinkyvyn on oltava > 90 prosenttia. DMSO-kantaja-ainekontrolli on validi, jos sen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvo on alle 250 prosenttia käsittelemättömien U937-solujen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvosta.
- Testiajoja pidetään valideina, jos vähintään kaksi kolmesta käsittelemättömien U937-solujen IgG1-arvosta on välillä $\geq 0,6$ ja $< 1,5$ prosenttia.
- Samaan aikaan testattua negatiivista kontrollia (maitohappo) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on negatiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi < 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).
- Positiivista kontrollia (TNBS) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on positiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi ≥ 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).

Testiraportti

23. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

- mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

- fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testausolosuhteet

- tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja
- kuvaus käytetystä testistä
- käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)
- käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot käytetyistä vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineesta
- menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

- solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut CD86:n stimulaatioindeksi-arvot verrattuna hyväksyttävyyalueisiin
- solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut stimulaatioindeksi-arvot verrattuna hyväksyttävyyalueisiin
- solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

Testimenettely

- tehtyjen ajojen lukumäärä
- testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)
- altistusaika
- kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä
- kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

- tietojen taulukointi: CV70 (tarvittaessa), stimulaatioindeksi-arvot, solujen elinkykyarvot, EC150-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta, ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella
- tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

- U-SENSTM-testillä saatujen tulosten tarkastelu
- testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Saatavana osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Saatavana osoitteessa [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Saatavana osoitteessa <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683–1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), s. 33. Saatavana osoitteessa [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Saatavana osoitteessa https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Lisäys 2.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (15).

CD86:n pitoisuus-vaste: Pitoisuudesta riippuvaisuudella (tai pitoisuus-vasteella) tarkoitetaan sitä, kun positiivista pitoisuutta ($\text{CD86 S.I.} \geq 150$) seuraa pitoisuus, joka suurentaa CD 86:n stimulaatioindeksiä.

Kemikaali: Aine tai seos.

CV70: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 70 prosenttia.

Muutos: Muutoksesta on kyse silloin, kun i) käsittelemättömän kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu $\% \text{CD86}^+$ -arvo on alle 50 prosenttia käsittelemättömien kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta $\% \text{CD86}^+$ -arvosta, ja ii) negatiivisen kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu $\% \text{CD86}^+$ -arvo on alle 50 prosenttia negatiivisten kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta $\% \text{CD86}^+$ -arvosta.

EC150: Arvioidut pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen stimulaatioindeksi on 150 prosenttia.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä

ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

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

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation, kuten hapetuksen, jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsyymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (14).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (14).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

S.I.: Stimulaatioindeksi. Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella käsiteltyjen solujen arvoihin.

Liutotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liutotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liutotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokitettavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia.

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testillä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (16).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (14).

Lisäys 2.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen U-SENSTM-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyuden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla CV70- ja EC150-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyuden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyuden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu U-SENSTM-testillä. Myös U-SENSTM-testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (1) (8).

Taulukko 1: Suositellut aineet U-SENSTM-testiä koskevan teknisen pätevyuden osoittamiseksi

Pätevyuden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysi-kaali-nen olo-muoto	<i>In vivo</i> -ennuste ¹	U-SENS TM Liuotin/ kantaja- aine	U-SENS TM CV70: viitealue yksikössä µg/ml ²	U-SENS TM EC150- viitealue yksikössä µg/ml ²
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliu os ³	<30	Positiivinen (≤10)
Pikryylisulfonihappo	2508-19-2	Neste	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliu os	>50	Positiivinen (≤50)
Dietyylimaleaatti	141-05-9	Neste	Herkistävä (kohtalainen)	DMSO	10-100	Positiivinen (≤20)
Resorsinoli	108-46-3	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Kasvatusliu os	>100	Positiivinen (≤50)
Kanelialkoholi	104-54-1	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (10–100)
4-allyylianisoli	140-67-0	Neste	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (<200)
Sakariini	81-07-2	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliu os	>200	Negatiivinen (>200)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliu os	>200	Negatiivinen (>200)
Salisyylihappo	69-72-7	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)

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

¹ *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (1) (8). *In vivo* -vaikutuskyky johdetaan

ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (17).

² Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (8).

³ Kasvatusliuos: RPMI-1640-kasvatusliuos, johon on lisätty 10 % vasikkasikiön seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (8).

Lisäys 3

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IL-8 LUC -TESTI

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. Toisin kuin testeissä, joissa analysoidaan solun pintamerkkiaineiden ilmentymistä, IL8 Luc -testissä kvantifioidaan muutoksia IL-8:n ilmentymisessä. IL-8 on dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvä sytokiini. THP-1-soluista johdetussa IL-8-reportterisolulinjassa (THP-G8, peräisin ihmisen akuutin monosyyttileukemian solulinjasta THP-1) IL-8:n ilmentymistä mitataan herkistävillä aineilla altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa käytetään apuna lusiferaasin ilmentymistä.
2. IL-8 Luc -testi on arvioitu validointitutkimuksessa (2), jonka tekivät JaCVAM (japanilainen vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus), **Japanin talous-, kauppa- ja teollisuusministeriö** (METI) sekä **JSAAE** (Japanin eläinkokeille vaihtoehtoisia menetelmiä kehittävä yhteisö). Sen jälkeen testille tehtiin riippumaton vertaisarviointi (3) JaCVAMin ja Japanin terveystyö- ja hyvinvointiministeriön (MHLW) sekä **vaihtoehtoisia testimenetelmiä koskevan kansainvälisen yhteistyöelimen** (ICATM) tuella. Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella IL-8 Luc -testiä pidetään käyttökelpoisena IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten IL-8 Luc -testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6).
3. On osoitettu, että IL-8 Luc -testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelystä ja lusiferaasin mittaamisesta. Laboratorion sisäinen toistettavuus oli 87,7 prosenttia ja laboratorioiden välinen toistettavuus 87,5 prosenttia (2). Validointitutkimuksesta (2) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) (6) saadut tiedot osoittavat, että LLNA-tietoihin verrattuna IL-8 Luc -testi luokitteli 118 kemikaalia 143:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 25 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottelemisessa ihoa herkistämättömistä aineista (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka Ei luokitusta) on 86 prosenttia (101/118), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 41 prosenttia (9/22). Kun jätetään jäljempänä kuvatun sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta (5 kohta), IL-8 Luc -testi luokitteli 113 kemikaalia 136:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 23 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 89 prosenttia (101/113), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 53 prosenttia (9/17). Kun käytetään julkaisussa Urbisch ja muut (7) lainattuja

tietoja ihmisistä, IL-8 Luc -testi luokitteli 76 kemikaalia 90:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 14 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 80 prosenttia (61/76), herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 39 prosenttia (7/18). Kun jätetään sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta, IL-8 Luc -testi luokitteli 71 kemikaalia 84:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 13 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 86 prosenttia (61/71) , herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 54 prosenttia (7/13). IL-8 Luc -testillä saadaan vääriä negatiivisia ennusteita todennäköisimmin kemikaaleilla, joiden ihoherkistyspotentiaali on vähäinen tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin niillä, joiden potentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (6). Kokonaisuutena nämä tiedot puoltavat IL-8 Luc -testin käyttöä ihon herkistymistä aiheuttavien vaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat IL-8 Luc -testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia testejä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että IL-8 Luc -testiä voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (*in vivo* -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (2) (6).
5. Vaikka IL-8 Luc -testissä käytettävä liuotin on X-VIVO™ 15, sillä määritettiin oikein kemikaalit, joiden Log K_{ow} -arvo on >3,5, ja ne, joiden vesiliukoisuus on noin 100 µg/ ml EPI Suite™-menetelmällä laskettuna, ja sen tehokkuus havaita vesiliukoisuudeltaan heikot herkistävät aineet onkin parempi kuin silloin, jos IL-8 Luc -testissä käytetään liuottimena dimetyylisulfoksidia (DMSO:ta) (2). Sellaisia testikemikaaleja koskevat negatiiviset tulokset, jotka eivät liukene pitoisuudella 20 mg/ml, voivat kuitenkin olla vääriä negatiivisia tuloksia, koska ne eivät pysty liukenemaan X-VIVO™ 15:een. Sen vuoksi tällaisia kemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia ei tule ottaa huomioon. Validointitutkimuksessa todettiin, että väärien negatiivisten tulosten osuus oli anhydridien osalta suuri. Lisäksi solulinjan rajallisen metaboloituvuuden (8) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohaptteenit (aineet, jotka vaativat metabolista aktivointia) ja prehaptteenit (aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa testissä negatiivisia tuloksia. Vaikka oletettuja pre-/prohaptteenia koskevia negatiivisia tuloksia on siis tulkittava varauksellisesti, IL-8 Luc -testi määrittäi oikein 11/11 prehaptteenia, 6/6 prohaptteenia ja 6/8 pre-/prohaptteenia IL-8 Luc -testin aineistossa (2). Pre- ja prohaptteenien havaitsemiseen tarkoitettua kolmen

eläinkokeettoman testin (DPRA, KeratinoSens™ ja h-CLAT) hiljattain tehdyn kattavan arvioinnin (9) ja sen perusteella, että IL-8 Luc -testissä käytettävissä THP-G8-soluissa on kyse solulinjasta, joka on peräisin h-CLAT-testissä käytetyistä THP-1-soluista, IL-8 Luc -testi voi osaltaan parantaa eläinkokeettomien testien herkkyyttä havaita pre- ja prohapteneja muihin testeihin yhdistettynä. Tähän mennessä testatuista pinta-aktiivisista aineista saatiin (väärää) positiivisia tuloksia riippumatta niiden tyypistä (ts. kationinen, anioninen tai ioniton). Kemikaalit, jotka häiritsevät lusiferaasia, voivat häiritä myös sen aktiivisuutta/mittausta ja aiheuttaa näennäistä inhibiota tai luminesenssin lisääntymistä (10). Esimerkiksi fytoestrogenipitoisuuksien, jotka ovat suurempia kuin 1 µM, on raportoitu vaikuttavan häiritsevästi luminesenssisignaaleihin muissa lusiferaasipohjaisissa reportterigeenitesteissä, mikä johtuu lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta. Tämän seurauksena lusiferaasin ilmentymistä, joka on saatu suurilla pitoisuuksilla fytoestrogeneja tai vastaavia yhdisteitä, joiden epäillään aiheuttavan fytoestrogenin tavoin lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, on tutkittava huolellisesti (11). Edellä sanotun perusteella pinta-aktiiviset aineet, anhydrit ja lusiferaasia häiritsevät kemikaalit eivät kuulu tämän testin sovellettavuusalueeseen. Jos voidaan osoittaa, ettei IL-8 Luc -testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

6. Kuten edellä on todettu, IL-8 Luc -testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelamisessa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten IL-8 Luc -testin tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa muihin tietolähteisiin yhdistettynä.
7. Määritelmät esitetään lisäyksessä 3.1.

TESTIN PERIAATE

8. IL-8 Luc -testissä käytetään ihmisen monosyyttileukemiasoluihin perustuvaa solulinjaa THP-1, joka on saatu American Type Culture Collectionista (Manassas, VA, Yhdysvallat). Tohokun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan dermatologian laitos valmisti tätä solulinjaa käyttämällä THP-1-soluihin perustuvan IL-8-reportterisolulinjan nimeltä THP-G8, joka sisältää vakaan lusiferaasioranssin (Stable Luciferase Orange, SLO) ja vakaan lusiferaasipunaisen (Stable Luciferase Red, SLR) lusiferaasigeenejä, joita IL-8 säätelee, sekä glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPDH) promoottoreita (1). Tämän avulla voidaan mitata lusiferaasigeenin induktiota: hyvin tunnettujen lusiferaasisubstraattien tuottamaan valoon perustuvan luminesenssin havaitseminen on indikaattori IL-8:n aktivoitumisesta ja GAPDH:sta soluissa herkistäville kemikaaleille altistamisen jälkeen.

9. Kaksivärisessä testissä käytetään oranssia valoa emittoivaa lusiferaasia (SLO; $\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) (12) IL-8:n promoottorigeenin ilmentymiseen ja punaista valoa emittoivaa lusiferaasia (SLR; $\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$) (13) sisäisen säätelyn promoottorigeenin, GAPDH:n, ilmentymiseen. Nämä kaksi lusiferaasia emittoivat eriväristä valoa reagoidessaan tulikärpäsen d-lusiferiiniin, ja niiden luminesenssi mitataan samanaikaisesti yhden vaiheen reaktiossa erottelemalla testiseoksen emissio käyttämällä optista suodatinta (14) (lisäys 3.2).
10. THP-G8-soluja käsitellään testikemikaalilla 16 tuntia, minkä jälkeen mitataan IL-8-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLO-lusiferaasin aktiivisuus (SLO-LA) ja GAPDH-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLR-lusiferaasin aktiivisuus (SLR-LA). Jotta lyhenteet olisi helpompi ymmärtää, SLO-LA-lyhenteestä käytetään jäljempänä muotoa IL8LA ja SLR-LA-lyhenteestä muotoa GAPLA. Taulukossa 1 selitetään IL-8 Luc -testissä käytettävät ilmaukset, jotka liittyvät lusiferaasiaktiivisuuteen. Mitattujen arvojen perusteella lasketaan normalisoitu IL8LA (nIL8LA), joka on IL8LA:n ja GAPLAN välinen suhde; nIL8LA:n induktio (Ind-IL8LA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA:n nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen nIL8LA:n arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde; sekä GAPLAN inhibitio (Inh-GAPLA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLAN nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen GAPLAN arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde ja jota käytetään sytotoksisuuden indikaattorina.

Taulukko 1: IL-8 Luc -testissä käytettävien lusiferaasiaktiivisuuteen liittyvien ilmausten selitykset

Lyhenteet	Määritelmä
GAPLA	SLR-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa GAPDH-promoottorin aktiivisuutta
IL8LA	SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8-promoottorin aktiivisuutta
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA / käsittelemättömien solujen nIL8LA
Inh-GAPLA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA / käsittelemättömien solujen GAPLA
CV05	Kemikaalin pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on < 0,05.

11. Saatavilla on suoritusvaatimukset (15), jotka helpottavat IL-8 Luc -testin kaltaisten muunneltujen *in vitro* -IL-8-lusiferaasitestien validointia. Myös OECD:n testiohjetta 442E voidaan muuttaa oikea-aikaisesti, kun nämä vaatimukset lisätään ohjeisiin. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data,

MAD) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten mukaisesti validoitujen testien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt nämä testit testiohjeeseen 442E (16).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

12. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 3.3 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (17). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettava tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 15 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 21–24 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

13. IL-8 Luc -testin vakiomenettely (Standard Operating Procedures, SOP) on saatavana, ja sitä pitäisi käyttää, kun laboratorio tekee testin (18). Laboratoriot, jotka haluavat tehdä testin, voivat tilata rekombinantin THP-G8-solulinjan GPC Lab. Co. Ltd:ltä (Tottori, Japani) tekemällä materiaalin siirtosopimuksen OECD:n malliin sisältyvien ehtojen mukaisesti. Seuraavissa kohdissa kuvataan testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

14. IL-8 Luc -testissä on käytettävä THP-G8-solulinjaa, joka tilataan GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista (ks. 8 ja 13 kohta). Vastaanoton jälkeen soluja propagoidaan (2–4 siirrostusta) ja säilytetään pakastettuina homogeenisena kantana. Tämän kannan soluja voidaan propagoida enintään 12 siirrostusta tai enintään kuuden viikon ajan. Propagoinnissa käytetään RPMI-1640-kasvatusliuosta, joka sisältää 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS:ää), antibiootti-/antimykoottiliuosta (100 U/ml penisilliini G:tä, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 0,25 µg/ml amfoterisiini B:tä 0,85-prosenttisessa suolaliuoksessa) (esim. GIBCO, luettelonro 15240-062), 0,15 µg/ml puromysiiniä (esim. CAS-nro 58-58-2) ja 300 µg/ml G418:aa (esim. CAS-nro 108321-42-2).
15. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Tämä testi on tehtävä sulatuksesta 1–2 viikon kuluttua tai 2–4 siirrostuksen jälkeen, ja siinä on käytettävä positiivista kontrollia, 4-nitrobentsyylibromidia (4-NBB) (CAS-nro 100-11-8, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia, maitohappoa (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %). 4-NBB:n tulisi tuottaa positiivinen vaste Ind-IL8LA:lle ($\geq 1,4$), kun taas maitohapon tulisi tuottaa negatiivinen vaste Ind-IL8LA:lle

(<1,4). Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Testi on tehtävä 22–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

16. Testausta varten THP-G8-solujen kylvötiheyden on oltava $2-5 \times 10^5$ solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa 48–96 tuntia. Testauspäivänä viljelypullosta kerätyt solut pestään RPMI-1640:llä, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja. Sen jälkeen solut resuspendoidaan RPMI-1640-liuokseen, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja, tiheyteen 1×10^6 solua/ml. Tämän jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle mustalle levyille (esim. Costar, luettelonro 3603) (50 µl) (5×10^4 solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

17. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. IL-8 Luc -testissä testikemikaalit liuotetaan X-VIVO™ 15 -liuottimeen, joka on kaupallisesti saatavilla oleva seerumiton kasvatusliuos (Lonza, 04-418Q), loppupitoisuuteen, joka on 20 mg/ml. X-VIVO™ 15:tä lisätään 20 mg:aan testikemikaalia (kemikaalin liukoisuudesta riippumatta) mikrosentrifugiputkessa 1 ml:n tilavuuteen. Sen jälkeen putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittimessa enimmäisnopeudella 8 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan 20 °C:n lämpötilassa. Jos kiinteät kemikaalit eivät ole vielä liuenneet, putkea käsitellään ultraäänellä, kunnes kemikaali on liennut kokonaan tai dispergoitunut stabiilisti. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien osalta liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:lla viisinkertaisesti ja käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena (4 mg/ml). Niiden testikemikaalien osalta, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een, seosta sekoitetaan uudestaan vähintään 30 minuutin ajan ja sen jälkeen sentrifugoidaan kierrosluvulla 15 000 rpm ($\approx 20\,000$ g) 5 minuutin ajan. Näin saatavaa supernatanttia käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena. Muiden liuottimien, kuten DMSO:n, veden tai kasvatusliuoksen, käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet. Yksityiskohtainen menettely kemikaalien liuottamiseksi esitetään lisäyksessä 3.5. X-VIVO™ 15 -liuokset (ks. 18–23 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä (ks. 16 kohta).
18. Ensimmäisen testiajon tarkoituksena on määrittää sytotoksinen pitoisuus ja tutkia kemikaalien ihoherkistyspotentiaalia. Testikemikaalien X-VIVO™ 15 -varastoliuoksista tehdään X-VIVO™ 15:n avulla sarjalaimennokset laimennuskertoimella 2 (ks. lisäys 3.5) käyttämällä 96-kuoppaista testiblokkia (esim. Costar, luettelonro EW-01729-03). Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien loppupitoisuudet ovat siis 0,002–2 mg/ml (lisäys 3.5). Niille testikemikaaleille, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, määritetään vain laimennuskertoimet välille $2-2^{10}$, vaikka testikemikaalien todelliset

loppupitoisuudet ovat epäselvät ja määräytyvät sen mukaan, mikä on testikemikaalien saturoitunut pitoisuus X-VIVO™ 15 -varastoliuoksessa.

19. Seuraavissa testiajoissa (ts. toiset, kolmannet ja neljännet rinnakkaisnäytteet) X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään neljä kertaa suurempi pitoisuus kuin se pitoisuus, jolla solujen elinkyky oli 05 (CV05; pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on <0,05) ensimmäisessä kokeessa. Jos Inh-GAPLA-arvo ei laske alle 0,05:n ensimmäisen testiajon suurimmalla pitoisuudella, X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään ensimmäisen ajon suurimman pitoisuuden mukaan. CV05-pitoisuus lasketaan jakamalla ensimmäisen ajon varastoliuoksen pitoisuus CV05:n laimennuskertoimella (X) (laimennuskerroin CV05 (X); laimennuskerroin, jolla varastoliuos saatiin laimennettua CV05-arvoon) (ks. lisäys 3.5). Niiden testiaineiden osalta, jotka eivät liukene X-VIVO-liuokseen pitoisuudella 20 mg/ml, CV05 määritetään varastoliuoksen pitoisuudella $x \cdot 1/X$. Testiajoihin 2–4 valmistetaan toinen varastoliuos kaavalla $4 \times CV50$ (lisäys 3.5).
20. X-VIVO™ 15:n toisista varastoliuoksista tehdään sarjalaimennokset laimennuskertoimella 1,5 käyttäen 96-kuoppaista testiblokkia. Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuopissa. Kunkin testikemikaalin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Näytteet sekoitetaan levysekoittajalla ja niitä inkuboidaan 16 tunnin ajan 37 °C:ssa (CO₂-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan jäljempänä kuvatulla tavalla.
21. Liuotinkontrolli on seos, joka sisältää 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa ja 50 µl solususpensiota / kuoppa RPMI-1640-liuoksessa, joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää.
22. Suositeltu positiivinen kontrolli on 4-NBB. 4-NBB:tä laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään X-VIVO™ 15:tä enintään 1 ml. Putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittajassa enintään 8 kierrosta minuutissa -kierrosluvulla vähintään 30 minuutin ajan. Sentrifugoinnin (20 000 g, 5 min) jälkeen supernatantti laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 4 ja 500 µl laimennettua supernatanttia siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Laimennettua supernatanttia laimennetaan lisää X-VIVO™ 15:llä kertoimilla 2 ja 4, ja 50 µl liuosta lisätään 50 µl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin (lisäys 3.6). Positiivisen kontrollin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37 °C, CO₂-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.
23. Suositeltu negatiivinen kontrolli on maitohappo. Maitohappoa laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään enintään 1 ml X-VIVO™ 15:tä (20 mg/ ml). Maitohappoliuos (20 mg/ml) laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 5 (4 mg/ml); 500

μl tästä maitohappoliuoksesta, jonka pitoisuus on 4 mg/ml, siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Tämä liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 2 ja sen jälkeen vielä kerran kertoimella 2, jotta saadaan liuokset, joiden pitoisuudet ovat 2 mg/ml ja 1 mg/ml. Näistä kolmesta liuoksesta ja kantaja-ainekontrollista (X-VIVO™ 15) 50 μl kutakin lisätään 50 μl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin. Negatiivisen kontrollin kukin pitoisuus testataan neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37 °C, CO₂-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.

24. Muita sopivia positiivisia tai negatiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet.
25. Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levyt kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa.
26. Testikemikaaleista ja liuotinkontrollista on tehtävä 2–4 ajoa, jotta voidaan tehdä positiivinen tai negatiivinen ennuste (ks. taulukko 2). Kukin ajo tehdään eri päivinä käyttämällä testikemikaaleista tuoretta X-VIVO™ 15 -varastoliuosta ja erikseen kerättyjä soluja. Solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrosta.

Lusiferaasiaktiivisuuden mittaukset

27. Luminesenssi mitataan käyttämällä 96-kuoppaisen mikrolevyn luminometriä, jossa on optiset suodattimet. Tällaisia laitteita ovat esimerkiksi Phelios (ATTO, Tokio, Japani), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Saksa) ja ARVO-sarja (PerkinElmer, Waltham, MA, Yhdysvallat). Luminometri on kalibroitava jokaiseen testiin toistettavuuden varmistamiseksi (19). Kalibrointia varten saatavana on rekombinantteja oranssia ja punaista valoa emittoivia lusiferaaseja.
28. Esilämmitettyä Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssia (Tripluc) laitetaan 100 μl kemikaalilla käsiteltyä tai käsittelemätöntä solususpensiota sisältävän levyn jokaiseen kuoppaan. Levyä sekoitetaan 10 minuuttia noin 20 °C:n lämpötilassa, ja sen jälkeen levy asetetaan luminometriin lusiferaasiaktiivisuuden mittaamiseksi. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1). Toisenlaisten asetusten (jotka määräytyvät esimerkiksi käytettävän luminometrin mallin mukaan) käyttäminen on perusteltava.
29. Jokaisen pitoisuuden parametrit lasketaan mitatuista arvoista, joita ovat IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, GAPLA:n keskiarvo ± keskihajonta, nIL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, Ind-IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta.

keskihajonta, Inh-GAPLA:n keskiarvo $\pm$ keskihajonta sekä Ind-IL8LA:n 95 prosentin luottamusväli. Tässä kohdassa käytettyjen parametrien määritelmät on esitetty lisäyksessä I ja IV.

30. Ennen mittausta monivärisissä reportteritesteissä tehdään yleensä värierottelu käyttämällä ilmaisimia (luminometri ja levylukija), joissa on optiset suodattimet, kuten tarkkuussuodattimet (yli- tai alipäästö) tai kaistanpäästösuodattimet. Suodattimien transmissiokertoimet jokaisen bioluminesenssisignaalin värin osalta on kalibroitava ennen testausta lisäyksen 3.2 mukaisesti.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

31. Positiivisen/negatiivisen päätöksen perusteissa edellytetään, että jokaisessa testiajossa
- IL-8 Luc -testin ennuste on positiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on $\geq 1,4$ ja Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on $\geq 1,0$
 - IL-8 Luc -testin ennuste on negatiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on $< 1,4$ ja/tai Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on $< 1,0$.

Ennustemalli

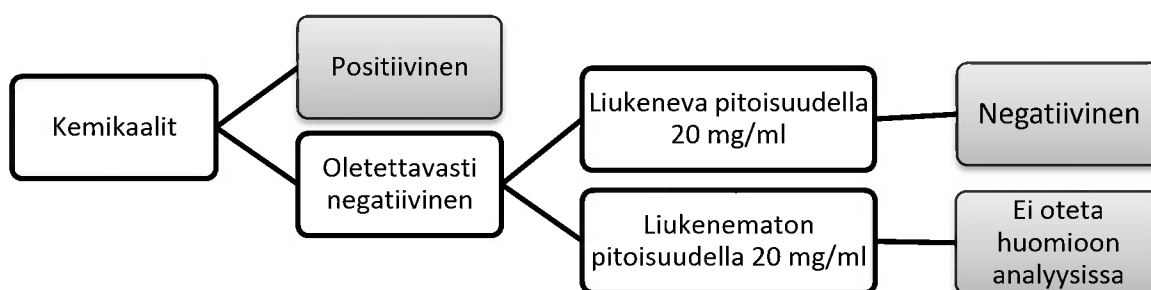
32. Testikemikaalit, joista saadaan kaksi positiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään positiivisiksi, kun taas ne testikemikaalit, joista saadaan kolme negatiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään oletettavasti negatiivisiksi (taulukko 2). Oletettavasti negatiivisista kemikaaleista ne, jotka liukenevat X-VOVOTM 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, katsotaan negatiivisiksi, kun taas ne, jotka eivät liukene tähän liuokseen tällä pitoisuudella, on jätettävä pois analyysistä (kuva 1).

Taulukko 2: Positiivisten ja oletettavasti negatiivisten kemikaalien määrittämisperusteet

1. testiajo	2. testiajo	3. testiajo	4. testiajo	Lopullinen ennuste
Positiivinen	Positiivinen	-	-	Positiivinen
	Negatiivinen	Positiivinen	-	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	-	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen

Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	Positiivinen
		Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
	Negatiivinen	-	Oletettavasti negatiivinen

Kuva 1: Lopullisen arvion ennustemalli



Hyväksymisperusteet

33. Seuraavien hyväksyntäperusteiden pitää täytyä IL-8 Luc -testiä käytettäessä:

- Ind-IL8LA-arvon on oltava yli 5,0 vähintään yhdellä positiivisen kontrollin (4-NBB) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.
- Ind-IL8LA-arvon on oltava alle 1,4 millä tahansa negatiivisen kontrollin (maitohappo) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.
- Sellaiset tiedot levyiltä, joissa soluja ja Triplucia mutta ei kemikaaleja sisältävien kontrollikuoppien GAPLA-arvo on alle viisi kertaa vain testiliuosta (50 µl RPMI-1640-liuosta (joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää) / kuoppa ja 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa) sisältävien kuoppien arvosta, on hylättävä.
- Tiedot levyiltä, joissa testi- tai kontrollikemikaalien kaikkien pitoisuuksien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05, on hylättävä. Tässä tapauksessa ensimmäinen testi on toistettava, jolloin toistetun testin suurin loppupitoisuus on edellisen testin pienin loppupitoisuus.

Testiraportti

34. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaalit

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

- mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli:

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot
- fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.
- tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)
- testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista hyväksymisperusteista.

Negatiivinen kontrolli:

- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t) ja/tai muut tunnisteet
- puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.
- fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos negatiiviset kontrollit ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja, ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa
- liuottimen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

- tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja
- kuvaus käytetystä testistä
- käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)
- FBC:n eränumero ja alkuperä, toimittajan nimi, 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn eränumero ja Tripluc-reagenssin eränumero
- siirrostusten lukumäärä ja testauksessa käytetty solutiheys
- testaamista edeltävään kylvöön käytetty solujen laskentamenetelmä ja toimenpiteet, joilla on varmistettu solujen määrän tasainen jakautuminen

- käytetty luminometri (esimerkiksi malli), myös instrumenttiasetukset, käytetty lusiferaasisubstraatti sekä lisäyksessä 3.2 kuvattuun kontrollitestiin perustuvien asianmukaisten luminesenssimittausten esittely
- menettely, jolla on osoitettu laboratorion pätevyys tehdä testi (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen) tai testin toistettavuus ajan mittaan.

Testimenettely

- rinnakkaisnäytteiden ja tehtyjen testiajojen lukumäärä
- testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)
- kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä
- kuvaus tutkimukselle asetetuista hyväksymisperusteista
- kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

- IL8LA- ja GAPLA-arvojen mittaukset
- nIL8LA-, Ind-IL8LA- ja Inh-GAPLA-arvojen laskelmat
- Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusväli
- kaavio, jossa kuvataan lusiferaasiaktiivisuuden induktion ja elinkyvyn annos-vastekäyrät
- tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

- IL-8 Luc -testillä saatujen tulosten tarkastelu
- testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359–69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371–9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816–30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337–51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275–84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147–155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646–57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286–91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271–9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891–4.
- (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic

- Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, saatavana osoitteessa http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046–9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Lisäys 3.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (20).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV05: Solujen elinkyky (cell viability) 05 eli pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.

FInSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Ind-IL8LA-arvoa. Ks. Ind-IL8LA:n määritelmä.

GAPLA: Vakaan lusiferaasipunaisen (SLR) lusiferaasiaktiivisuus (λ maks. = 630 nm), jota säätelee GAPDH:n promootori. Arvo kertoo solujen elinkyvyn ja elinkykyisten solujen lukumäärän.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

II-SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Inh-GAPLA-arvoa. Ks. Inh-GAPLA:n määritelmä.

IL-8 (interleukiini-8): Endoteelisoluista, fibroblasteista, keratinosyyteistä, makrofageista ja monosyyteistä saatava sytokiini, joka aiheuttaa neutrofiilien ja T-solulymfosyyttien kemotaksiaa.

IL8LA: Vakaan lusiferaasioranssin (SLO) lusiferaasiaktiivisuus (λ maks. = 580 nm), jota säätelee IL-8:n promootori.

Ind-IL8LA: IL8LA:n induktiokerroin. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA-arvo stimuloimattomien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien aiheuttamasta IL-8:n promoottorin aktivoitumisesta.

Inh-GAPLA: GAPLA:n inhibitio. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA-arvo käsittelemättömien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien sytotoksisuudesta.

Vähimmäisinduktioraja: Pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

nIL8LA: SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta (IL8LA) normalisoituna SLR-lusiferaasiaktiivisuudella, joka kuvastaa GAPDH:n promoottorin aktiivisuutta (GAPLA). Se kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta solujen elinkyky tai solujen lukumäärä huomioon ottaen.

nSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa nIL8LA-arvoa. Ks. nIL8LA:n määritelmä.

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

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsyymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus

(vastaavuus) (16).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (16).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

SLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa IL8LA-arvoa. Ks. IL8LA:n määritelmä.

SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa GAPLA-arvoa. Ks. GAPLA:n määritelmä.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita. Tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena. (TG437)

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

THP-G8: IL-8-reportterisolulinja, jota käytetään IL-8 Luc -testissä. Ihmisen makrofagin kaltaiseen THP-1-solulinjaan transfektoitiin SLO- ja SLR-lusiferaasigeenit IL-8:n ja GAPDH:n promoottorien säätelemänä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (21).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testimenetelmä: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen.

Lisäys 3.2

LUSIFERAASIAKTIIVISUUDEN MITTAUSPERIAATE JA OPTISEN SUODATTIMEN TRANSMISSIOKERTOIMIEN MÄÄRITTÄMINEN SLO:TA JA SLR:ÄÄ VARTEN

MultiReporter-testijärjestelmää (Tripluc) voidaan käyttää sellaisen mikrolevytyyppisen luminometrin kanssa, jossa on monivärinen havaintojärjestelmä ja johon voidaan liittää optinen suodatin (esim. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Mittauksessa käytettävä optinen suodatin on 600–620 nm:n yli- tai alipäästösuo-datin tai 600–700 nm:n kaistanpäästösuo-datin.

Kaksiväristen lusiferaasien mittaaminen optisella suodattimella.

Tässä esimerkissä käytettävä laite on Phelios AB-2350 (ATTO). Tässä luminometrissä on 600 nm:n ylipäästösuo-datin (R60 HOYA Co.), 600 nm:n ylipäästösuo-datin 1) SLO:n ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) ja SLR:n ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$) luminesenssin jaotteluun.

Jotta voidaan määrittää 600 nm:n ylipäästösuo-dattimen transmissiokertoimet, mitataan puhdistettuja SLO- ja SLR-lusiferaasientsyymejä käyttämällä i) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti ilman suodatinta (F_0), ii) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti, joka läpäisi 600 nm:n ylipäästösuo-dattimen (suodatin 1) ja iii) lasketaan 600 nm:n ylipäästösuo-dattimen transmissiokertoimet SLO:lle ja SLR:lle jäljempänä selostetun mukaisesti.

Transmissiokerroin		Lyhenne	Määritelmä
SLO	Suodatin 1 Transmissiokerroin	κO_{R60}	Suodattimen transmissiokerroin SLO:lle
SLR	Suodatin 1 Transmissiokerroin	κR_{R60}	Suodattimen transmissiokerroin SLR:lle

Jos testinäytteen SLO:n ja SLR:n intensiteetti määritetään kirjaimilla O ja R, i) valon intensiteetti ilman suodatinta (optinen) F_0 ja ii) valon intensiteetti, joka siirtyy 600 nm:n ylipäästösuo-dattimen läpi (suodatin 1) F_1 , kuvataan jäljempänä selostetun mukaisesti.

$$F_0 = O + R$$

$$F_1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Nämä kaavat voidaan ilmaista myös näin:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

O- ja R-arvo lasketaan käyttämällä laskettuja transmissiokertoimia (κO_{R60} ja κR_{R60}) ja mitattuja F0- ja F1-arvoja seuraavasti:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Transmissiokertoimen määrittämisessä tarvittavat materiaalit ja käytettävät menetelmät

1) Reagenssit

Yksittäiset puhdistetut lusiferaasientsyymit:

Kylmäkuivattu puhdistettu SLO-entsyymi

Kylmäkuivattu puhdistettu SLR-entsyymi

(joille on saatu validointitiedot GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista THP-G8-solulinjan kanssa)

Testireagenssi:

Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssi (toimittaja esimerkiksi TOYOBO, luettelonro MRA-301)

Kasvatusliuos: Lusiferaasitestille (30 ml, säilytys 2–8 °C)

Reagenssi	Pit.	Loppupit. kasvatusliuoksessa	Tarvittava määrä
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Entsyymiliuoksen valmistus

Liuota kylmäkuivattu puhdistettu lusiferaasientsyymi putkessa lisäämällä 200 µl Tris/HCl:ää (10 ~ 100 mM) tai Hepes/HCl:ää (pH 7,5 ~ 8,0), jota on täydennetty 10 prosentilla (paino/tilavuus) glyserolia. Jaa entsyymiliuos 10 µl:n alikvootteihin 1,5 ml:n kertakäyttöputkiin ja laita ne pakastimeen -80 °C:seen. Pakastettua entsyymiliuosta voidaan käyttää enintään kuusi kuukautta. Kun liuosta tarvitaan, lisää jokaiseen entsyymiliuosta (laimennettu entsyymiliuos) sisältävään putkeen 1 ml lusiferaasitestin kasvatusliuosta (RPMI-1640, sis. 10 % FBS:ää) ja laita ne jäähauteeseen

deaktivoitumisen estämiseksi.

3) *Bioluminesenssin mittaaminen*

Sulata Tripluc[®]-lusiferaasitestin reagenssi (Tripluc) ja säilytä sitä huoneenlämpötilassa joko vesihauteessa tai ympäröivän ilman lämpötilassa. Kytke luminometriin virta 30 minuuttia ennen mittauksen aloittamista, jotta valomonistin ehtii stabiloitua. Laita 100 µl laimennettua entsyymiliuosta mustalle 96-kuoppaiselle levyille (tasapohja) (SLO-vertailunäyte kuoppiin B1, B2, B3 ja SLR-vertailunäyte kuoppiin D1, D2, D3). Laita sen jälkeen pipetillä 100 µl esilämmitettyä Triplucia levyn jokaiseen kuoppaan, joka sisältää laimennettua entsyymiliuosta. Ravista levyä noin 10 minuuttia huoneenlämpötilassa (noin 25 °C) levyravistelijaa käyttäen. Poista kuplat, jos niitä ilmaantuu kuopissa oleviin liuoksiin. Aseta levy luminometriin ja mittaa lusiferaasiaktiivisuus. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1).

Optisen suodattimen transmissiokerroin laskettiin näin:

Transmissiokerroin (SLO (κ_{OR60})) = $(F1:n B1 + F1:n B2 + F1:n B3) / (F0:n B1 + F0:n B2 + F0:n B3)$

Transmissiokerroin (SLR (κ_{OR60})) = $(F1:n D1 + F1:n D2 + F1:n D3) / (F0:n D1 + F0:n D2 + F0:n D3)$

Laskettuja transmissiokertoimia käytetään kaikkiin mittauksiin, jotka tehdään samalla luminometrillä.

Laitteiden laadunvalvonta

IL-8 Luc -protokollassa kuvattuja menettelyjä on käytettävä (18).

Lisäys 3.3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen ennuste IL-8 Luc -testistä kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyyden osoittamiseen tarkoitettulle aineelle ja saamalla arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyyden osoittamiseen tarkoitettusta aineesta (jotka on valittu edustamaan ihon herkistymisvaarojen vastealuetta). Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu IL-8 Luc -testillä. Myös IL-8 Luc -testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (6) (1).

Taulukko 1: Suositellut aineet IL-8 Luc -testiä koskevan teknisen pätevyyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettut aineet	CAS-nro	Olomuoto	Liukoisuus X-VIVO15:ssä, pit. 20 mg/ml	<i>In vivo</i> -ennuste ¹	IL-8 Luc -ennuste ²	Viitealue (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehydi	50-00-0	Neste	Liukoinen	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	9-30	4-9
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	250-290	60-250
Etyleenidiamiini	107-15-3	Neste	Liukoinen	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	500-700	0,1-0,4
Etyleeniglykolidimeta-krylaatti	97-90-5	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,04-0,1
4-allyylianisoli (estragoli)	140-67-0	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,01-0,07
Streptomysiinisulfaatti	3810-74-0	Kiinteä	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Glyseroli	56-81-5	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000

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

¹ *In vivo* potenssi on saatu käyttämällä ECETOC:n esittämiä kriteerejä (19).

² Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (6).

³ CV05 ja IL-8 Luc MIT laskettiin käyttämällä EPI SuiteTM:llä saatua vesiliukoisuutta.

⁴ CV05: pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.

⁵ MIT: pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

Lisäys 3.4

SUHDELUVUT JA ARVIOINTIPERUSTEET

nIL8LA (nSLO-LA)

I-pitoisuuden ($i = 0-11$) j:s toisto ($j = 1-4$) mitataan IL8LA-arvolle (SLO-LA) ja GAPLA-arvolle (SLR-LA). Normalisoitu IL8LA, josta käytetään lyhennettä nIL8LA (nSLO-LA), määritetään näin:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Tämä on mittauksen perusyksikkö tässä testissä.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Keskimääräisen nIL8LA:n (nSLO-LA) induktiokerroin, joka koskee i:n pitoisuuden toistoa verrattuna siihen 0-pitoisuuden yhteydessä (Ind-IL8LA), on tärkein luku tässä testissä. Tämä suhde saadaan seuraavalla kaavalla:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Johtava laboratorio on ehdottanut, että arvo 1,4 vastaa positiivista tulosta testatulle kemikaalille. Tämä arvo perustuu johtavan laboratorion aikaisempien tietojen tarkasteluun. Aineistonhallintaryhmä käytti tätä arvoa sittemmin kaikissa validointitutkimuksen vaiheissa. Tärkein tulos, Ind-IL8LA, on kahden aritmeettisen keskiarvon suhde, kuten yhtälö osoittaa.

95 prosentin luottamusväli (95 % CI)

Suhdelukuun perustuvalla 95 prosentin luottamusvälillä (95 % CI) voidaan arvioida tämän tärkeimmän tulosluvun tarkkuutta. Jos 95 prosentin luottamusvälin alaraja on ≥ 1 , se osoittaa, että i:n pitoisuuteen liittyvä nIL8LA on huomattavasti suurempi kuin liuotinkontrollilla saatu arvo. On monia tapoja laskea 95 prosentin luottamusväli. Tässä tutkimuksessa olemme käyttäneet Fiellerin teoreema -nimistä menetelmää. Tämä 95 prosentin luottamusväli -teoreema saadaan seuraavalla kaavalla:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

jossa

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \text{sd}_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ on keskeisen t-jakauman 97,5-persentiili ja v on vapausaste, jossa

$$v = \left(\frac{\text{sd}_0^2}{n_0} + \frac{\text{sd}_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{\text{sd}_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{\text{sd}_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA on keskimääräisen GAPLA-arvon (SLR-LA) suhde i:n pitoisuuden toistoon verrattuna liuotinkontrollin arvoon, ja se lasketaan näin:

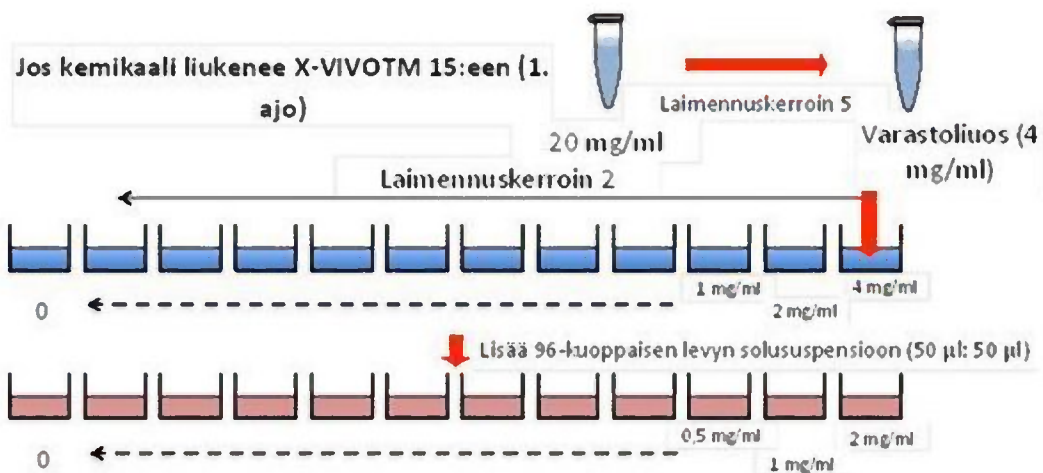
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Koska GAPLA on nIL8LA:n nimittäjä, erittäin pieni arvo aiheuttaa suurta vaihtelua nIL8LA-arvoissa. Sen vuoksi Ind-IL8LA-arvot, joihin liittyy erittäin pieni Inh-GAPLA-arvo (alle 0,05), on syytä tulkita huonoksi tarkkuudeksi.

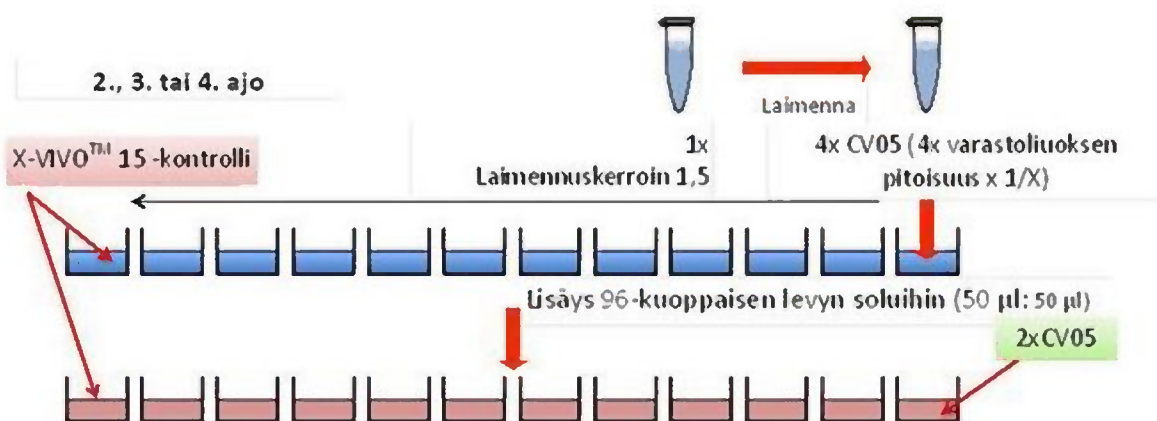
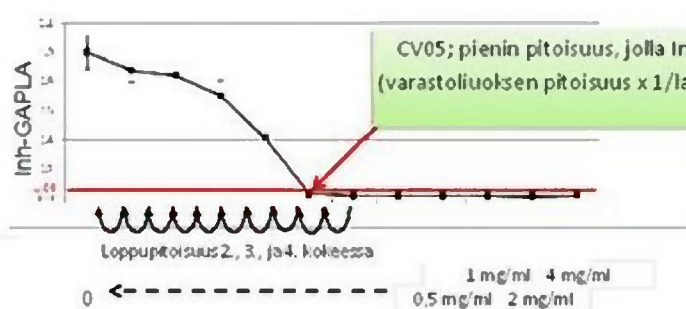
Lisäys 3.5

KEMIKAALIEN LIUOTTAMISMENETELMÄT IL-8 LUC -TESTISSÄ.

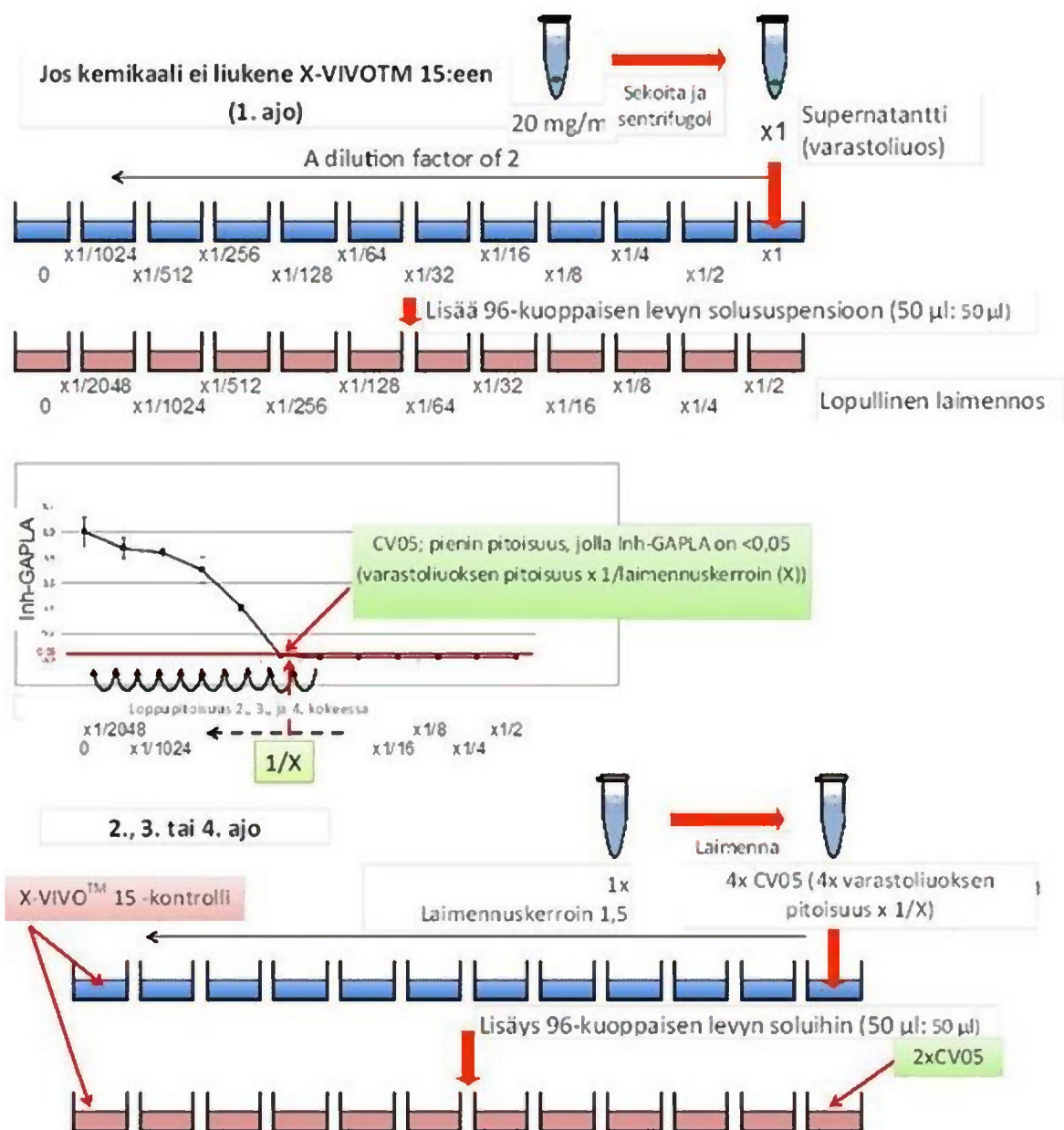
- a) Kemikaalit, jotka liukenevat X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml



Määritä seuraavien kokeiden suurin pitoisuus

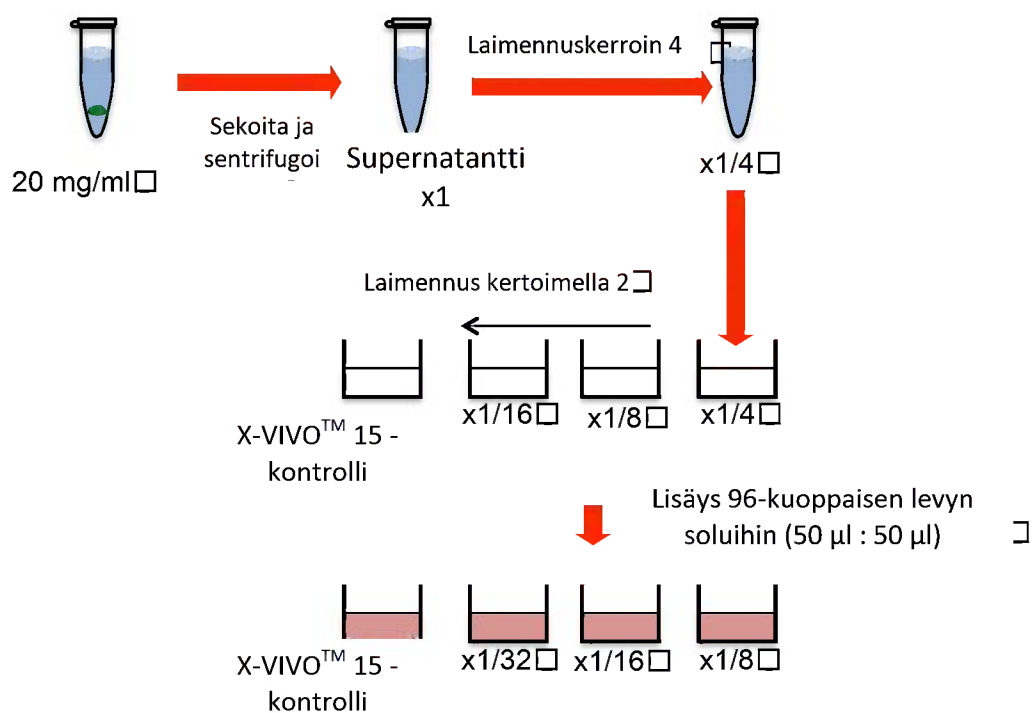


b) Kemikaalit, jotka eivät liukene X-VIVOTM 15:een pitoisuudella 20 mg/ml



Lisäys 3.6**4-NBB:N LIUOTTAMISMENETELMÄ IL-8 LUC -TESTIN POSITIIVISTA KONTROLLIA VARTEN.**

Positiivinen kontrolli: 4-NBB (ei liukene X-VIVO™ 15:een) □



”

9) Lisätään C osaan seuraavat luvut:

”C.52 MEDAKALLA TEHTÄVÄ PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 240 (2015). Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä (MEORG-testi) kuvataan laaja testimenetelmä, joka perustuu kalojen altistamiseen useiden sukupolvien ajan. Testistä saadaan oleellista tietoa kemikaalien aiheuttamien ympäristöriskien ja muiden riskien arviointiin, myös hormonaalisten haitta-aineiden osalta. Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä altistusta jatketaan kuoriutumiseen (kaksi viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) saakka toisessa sukupolvessa (F2). Lisää tutkimusta tarvitaan sen hyödyllisyyden perustelemiseksi, että F2-sukupolven tutkimusta jatkettaisiin kuoriutumisen jälkeen; tällä hetkellä tietoa on liian vähän, jotta voitaisiin laatia asianmukaiset ehdot tai perusteet F2-sukupolven tutkimuksen pidentämiselle. Tätä testimenetelmää voidaan kuitenkin päivittää uusien tietojen ja tutkimustulosten myötä. Ohjeet esimerkiksi F2-sukupolven tutkimuksen pidentämisestä lisääntymisen osalta voivat olla hyödyllisiä tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi kemikaalit, joiden biokertyvyyspotentiaali on suuri tai jos on merkkejä sukupolvien välisistä vaikutuksista muissa taksoneissa). Tätä testimenetelmää voidaan käyttää kemikaalien ja myös mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden mahdollisten pitkäaikaisten, kaloihin kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa. Menetelmässä keskitytään ensisijaisesti mahdollisiin populaation kannalta merkityksellisiin vaikutuksiin (ts. eloonjäämiseen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiseen kohdistuviin haittavaikutuksiin), jotta voidaan laskea NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration, pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) tai ECx-arvo (Effect Concentration, vaikuttava pitoisuus). On kuitenkin syytä todeta, että ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat soveltuvat vain harvoin tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien määrän lisääminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi voi olla epäkäytännöllistä, ja se voi aiheuttaa myös merkittäviä huolenaiheita eläinten hyvinvoinnista, koska niissä tarvitaan paljon koe-eläimiä. Muut testimenetelmät voivat olla sopivampia sellaisille kemikaaleille, jotka eivät edellytä usean sukupolven mittaista arviointia tai jotka eivät ole mahdollisia hormonaalisia haitta-aineita (1), Medaka on tarkoituksenmukainen laji käytettäväksi tässä testimenetelmässä, koska sen elinkaari on lyhyt ja koska on mahdollista määrittää sen geneettinen sukupuoli (2), jota pidetään tärkeänä seikkana tässä testimenetelmässä. Tässä menetelmässä kuvatut menettelyt ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa. Muut pienet kalalajit (esimerkiksi seeprakala) voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä.

2. Tässä testimenetelmässä mitataan useita biologisia päätetapahtumia. Pääpainopiste on mahdollisissa populaation kannalta merkityksellisissä parametreissa, joita ovat esimerkiksi eloonjääminen, kokonaiskehitys, kasvu ja lisääntyminen. Jotta saadaan mekanistista tietoa ja voidaan todeta yhteys muiden kenttä- ja laboratoriotutkimusten tulosten välillä, kun kemikaalin mahdollisesta hormonitoimintaa häiritsevistä vaikutuksesta (kuten androgeenisesta tai estrogeenisestä aktiivisuudesta muissa testeissä ja määrittelyissä) on *a posteriori* -näyttöä, hankitaan myös muuta hyödyllistä tietoa mittaamalla *vitellogeniinin* (*vtg*) mRNA (tai vitellogeniiniproteiini, VTG) sekä geneettiseen sukupuoleen liittyvät fenotyyppiset sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja arvioidaan histopatologiaa. Jos testikemikaalin tai sen metaboliittien ei oleteta olevan hormonaalisia haitta-aineita, näitä toissijaisia päätetapahtumia ei välttämättä ole tarpeen mitata, ja sellaiset tutkimukset, joissa tarvitaan vähemmän resursseja ja koe-eläimiä, voivat olla tarkoituksenmukaisempia (1). Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, ja validointiin osallistui vain muutama laboratorio. Sen vuoksi on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, tämä testimenetelmä arvioidaan ja sitä muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. Tietoja voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 5 (3). Testin alussa sukukypsät kalat (sukupolvi F0) altistetaan testikemikaalille lisääntymisvaiheessa. Altistusta jatketaan F1-sukupolven osalta kehitys- ja lisääntymisvaiheeseen ja F2-sukupolven osalta kuoriutumisvaiheeseen. Näin testissä voidaan arvioida sekä rakenteellisia että aktivaatioon perustuvia endokriinisiä reittejä. Endokriinisten päätetapahtumien tulkinnassa voidaan soveltaa näyttöön perustuvaa lähestymistapaa.
4. Testissä on oltava riittävä määrä yksilöitä, jotta lisääntymisen kannalta merkityksellisten päätetapahtumien arvioinnin voima on riittävä (ks. lisäys 3). Samalla on kuitenkin huolehdittava siitä, että testissä käytetään mahdollisimman vähän koe-eläimiä eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Käytettävien koe-eläinten suuren määrän vuoksi on tärkeää arvioida testin tarpeellisuus huolellisesti siihen nähden, että olemassa olevat tutkimustulokset voivat jo sisältää oleellista tietoa monista tämän MEORG-testin päätetapahtumista. Tältä osin OECD:n kaloihin kohdistuvan myrkyllisyyden testausta koskevista toimintaohjeista (1) voi olla apua.

5. Testimenetelmä on suunniteltu ensisijaisesti erottelemaan yhdestä ainesosasta koostuvan aineen vaikutukset. Jos seoksen testaaminen on kuitenkin tarpeen, on arvioitava, saadaanko testistä hyväksyttäviä tuloksia aiottuun sääntelytarkoitukseen.
6. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen.

TESTIN PERIAATE

7. Testi aloitetaan altistamalla sukukypsistä koiras- ja naaraskaloista (vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) koostuvat lisääntymisparit testikemikaalille kolmeksi viikoksi, jona aikana sitä annostellaan vanhemman sukupolven (F0) organismiin kemikaalin toksikokineettisen käyttäytymisen mukaisesti. Mahdollisimman lähellä neljännen viikon ensimmäistä päivää kerätään munat, joista syntyy F1-sukupolvi. F1-sukupolven kehittymisen aikana (yhteensä 15 viikkoa) arvioidaan kuoriutumista ja eloonjäämistä. Lisäksi kaloista otetaan näytteet 9–10 viikolla hedelmöittymisen jälkeen kehitykseen liittyvien päätetapahtumien tutkimiseksi, ja kutemista arvioidaan kolmen viikon ajan hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 12–14. F2-sukupolvi luodaan kolmannen viikon jälkeen lisääntymisen arvioinnista, ja sitä kasvatetaan siihen saakka, kunnes kuoriutuminen on tapahtunut.

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

8. Testin validiteettiä sovelletaan seuraavia kriteerejä:
 - Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.
 - Veden keskimääräisen lämpötilan on oltava 24–26 °C koko tutkimuksen ajan. Yksittäisten akvaarioiden lyhytaikaiset poikkeamat tästä keskiarvosta saavat olla enintään 2 °C.
 - Kummankin sukupolven (F0 ja F1) kontrollien keskimääräisen fekunditeetin on oltava suurempi kuin 20 munaa paria kohti päivässä. Kaikkien arviointijakson aikana tuotettujen munien hedelmällisyyden on oltava enemmän kuin 80 prosenttia. Lisäksi 16 parin suositelluista 24 kontrolliparista (> 65 prosenttia) tulisi tuottaa enemmän kuin 20 munaa paria kohti päivässä.
 - Kontrollipareilla munien kuoriutumisasteen on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2).

- F1-sukupolven osalta kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden kolmannelle hedelmöittymisen jälkeiselle viikolle ja siitä lähtien tutkimuksen päättymiseen saakka (ts. 15. viikko hedelmöittymisen jälkeen) on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) ja ≥ 90 prosenttia (keskiarvo) vastaavissa kontrolleissa (F1).
- Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Veden lämpötilan osalta (vaikka se ei olekaan validiteettikriteeri) käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

9. Vaikka suuremmissa pitoisuusryhmissä voi olla havaittavissa lisääntymiskyvyn heikkenemistä, lisääntymisen on kuitenkin oltava riittävää vähintään kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja kaikissa sitä pienemmän pitoisuuden ryhmässä F0-sukupolvessa, jotta kuoriutumiskubaattorit olisivat tarpeeksi täysiä. Lisäksi F1-sukupolven kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja sitä pienemmän pitoisuuden altistusryhmissä on oltava riittävästi eloonjääneitä alkioita, jotta päätetapahtumaa voidaan arvioida poikasvaiheen näytteenotossa (ks. 36 ja 38 kohta ja lisäys 9). F1-sukupolven toiseksi suurimman pitoisuuden ryhmässä kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden on täytettävä vähimmäisvaatimus ($\sim 20\%$). Nämä eivät ole varsinaisia validiteettikriteerejä, vaan suosituksia, jotta voidaan laskea pitävät NOEC-arvot.
10. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

11. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

- a) happi- ja pH-mittarit
- b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen
- c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan
- d) kemiallisesti inertistä materiaalista valmistetut säiliöt, jotka ovat riittävän suuria suhteessa suositeltuun kalamäärään ja kalatiheyteen (ks. lisäys 3)
- e) riittävän tarkka vaaka (tarkkuus $\pm 0,5$ mg).

Vesi

12. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testikemikaalia) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, on otettava säännöllisin väliajoin näytteitä määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin $\pm 0,5$ pH-yksikköä.

Altistusjärjestelmä

13. Altistusjärjestelmän rakennetta ja käytettäviä materiaaleja ei ole määritetty tarkasti. Testijärjestelmän rakentamisessa on käytettävä lasia, ruostumatonta terästä tai muita kemiallisesti inerttejä materiaaleja, eikä järjestelmä ole saanut kontaminoitua edellisissä testeissä. Tähän testiin hyvin sopiva altistusjärjestelmä voi olla esimerkiksi laitteisto, jossa on jatkuva läpivirtaus (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testiliuokset

14. Testikemikaalin varastoliuosta on laitettava altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Kunkin kammion testiliuoksen on vaihduttava asianmukaisesti (esim. tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 ja enintään 16 kertaa päivässä tai virtauksen on oltava vähintään 20 ml/min) sen mukaan, millainen on testikemikaalin stabiilius ja veden laatu.
15. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksesta laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (14) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrityksiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat,

ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on eläinten hyvinvointiin liittyviä seurauksia, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan nro 23 (Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jos liuottimia käytetään kantaja-aineena, asianmukaiset liuotinkontrollit on arvioitava muiden (negatiivisten) kontrollien lisäksi, jotka eivät ole liuottimia (pelkkä laimennusvesi). Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (15), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. < 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdollinen vaikutus mitattuihin päätetapahtumiin (16).

Koe-eläimet

Kalojen valinta ja hoito

16. Testilajiksi on valittu medaka (*Oryzias latipes*) sen lyhyen elinkaaren ja geneettisen sukupuolen määrittämismahdollisuuden vuoksi. Vaikka muut pienet kalalajit voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa (ks. 1 kohta). Medakan on jo osoitettu lisääntyvän vankeudessa; sen kasvattamismenetelmiä on julkaistu (17) (18) (19), ja saatavana on tietoja lyhyen aikavälin kuolleisuutta sekä elinkaaren alkuvaihetta ja koko elinkaarta käsittelevistä testeistä (5) (6) (8) (9) (20). Kaloja on pidettävä olosuhteissa, joissa on 16 h valoisaa ja 8 h pimeää. Kaloja ruokitaan elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) naupliusasteen toukilla, ja tarvittaessa ruokintaa voidaan täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta.
17. Kunhan noudatetaan asianmukaisia eläintenhoitokäytäntöjä, erityistä kasvatusprotokollaa ei tarvita. Medakaa voidaan kasvattaa esimerkiksi kahden litran säiliöissä siten, että yhdessä säiliössä on 240 kalanpoikasta neljänteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka. Sen jälkeen niitä kasvatetaan 10 kalan erissä kahden litran säiliötä kohti kahdeksanteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka, jolloin ne siirretään lisääntymispareiksi kahden litran säiliöihin.

Totuttautumisvaihe ja kalojen valinta

18. Testikalat on valittava yhdestä laboratorioskannasta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä (huom. tämä totuttautumisvaihe ei ole altistusta edeltävä vaihe *in situ*). Testikalat on suositeltavaa hankkia laboratorion omasta kasvattamosta, koska sukukypsien kalojen kuljettaminen on kaloille stressaavaa ja voi vaikuttaa kutemiseen haitallisesti. Kaloja on ruokittava suolalehtijalkaisten nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä tarkkailujakson ja altistusjakson ajan. Tarvittaessa ruokintaa voi täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Tämän testin aloittamiseksi tarvitaan vähintään 42 lisääntyvää paria (54 paria, jos testissä tarvitaan liuotinkontrolli osin sen vuoksi, ettei pelkän liuotinkontrollin käyttöä tukevia aikaisempia tietoja ole), jotta rinnakkaisnäytteitä saadaan riittävästi. Lisäksi jokaisen F0-sukupolven lisääntyvästä parista on varmistettava, että ne ovat XX–XY (ts. että kummallakin sukupuolella on normaali määrä sukupuolikromosomeja), jotta testiin ei vahingossa oteta spontaanisti XX-tyypin koiraita (ks. 39 kohta).
19. Totuttautumisvaiheessa kuolleiden kalojen määrä on kirjattava ylös, ja 48 tunnin asettautumisajan jälkeen on noudatettava seuraavia kriteerejä:
 - Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: koko erä hylätään.
 - Jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: totuttautumista jatketaan vielä seitsemän päivää kahden viikon totuttautumisvaiheen jälkeen. Jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia näiden seuraavien seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään.
 - Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: erä hyväksytään.
20. Kaloille ei tule antaa hoitoa sairauteen testiä edeltävän kahden viikon totuttautumisajan eikä altistusjakson aikana, ja sairauden hoitoa tulee välttää kokonaan, mikäli se on mahdollista. Tutkimuksessa ei tule käyttää kaloja, joilla on merkkejä jostakin sairaudesta. Tiedot havainnoista ja mahdollisista profylaktisista käsittelyistä ja sairauden hoidoista testiä edeltävän kasvatusvaiheen aikana on säilytettävä.
21. Altistusjakso on aloitettava sukupuolisesti dimorfisilla täysikasvuuisilla kaloilla, joiden geneettinen sukupuoli on määritetty ja jotka ovat peräisin laboratorion sukukypsien eläinten kannasta, joita on kasvatettu 25 ± 2 °C:ssa. Kalojen on oltava sellaisia, joiden on osoitettu tuottaneen (elinkykyisiä) jälkeläisiä altistusta edeltäneellä viikolla. Testissä käytettävien kalojen koko ryhmän osalta yksittäisten kalojen sukupuolen mukaisen painon on oltava testin alussa ± 20 prosentin sisällä saman sukupuolen aritmeettisesta

keskiarvopainosta. Osa kaloista on punnittava ennen testiä keskimääräisen painon arvioimiseksi. Valittujen kalojen on oltava iältään vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen, ja niiden painon on oltava ≥ 300 mg (naaraat) ja ≥ 250 mg (koiraat).

TESTISUUNNITELMA

Testipitoisuudet

22. Testissä on suositeltavaa käyttää viittä kemikaalipitoisuutta ja kontrollia (kontrolleja). Testipitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon kaikki tiedonlähteet, kuten kvantitatiiviset rakenne-aktiivisuussuhteet (QSAR-mallit), vertailutiedot analogeista, tulokset esimerkiksi kalatesteistä akuutti myrkyllisyys kalalle (tämän liitteen luku C.1), kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus (tämän liitteen luku C.48) tai muut testimenetelmät esimerkiksi tämän liitteen luvuissa C.15, C.37, C.41, C.47 tai C.49 (21) (22) (23) (24) (25) (26), mikäli ne ovat saatavilla, tai tarvittaessa tulokset annoksenmäärittäystestissä, joka sisältää mahdollisesti myös lisääntymisvaiheen. Tarvittaessa voidaan tehdä annoksenmäärittäystesti samantlaisissa olosuhteissa kuin lopullinen testi (veden laatu, testijärjestelmä, eläinten lukumäärä). Jos liuottimen käyttö on tarpeen ja jos aikaisempia tietoja ei ole saatavilla, annoksenmäärittäystesti voidaan tehdä liuottimen sopivuuden selvittämiseksi. Suurin testipitoisuus ei saa ylittää 96h-LC50:een liittyvää vesiliukoisuutta 10 mg/l tai 1/10 (27). Pienimmän pitoisuuden on oltava 10–100 kertaa pienempi kuin suurimman pitoisuuden. Viiden pitoisuuden käyttäminen tässä testissä mahdollistaa annos-vastesuhteiden mittaamisen mutta myös LOEC- ja NOEC-arvojen määrittämisen; niitä tarvitaan tietyissä sääntelyohjelmissa tai tietyillä lainkäyttöalueilla riskinarviointiin. Yleensä testikemikaalin nimellispitoisuuksien välinen porrastuskerroin vierekkäisten käsittelytasojen välillä on $\leq 3,2$.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

23. Yhtä testipitoisuutta kohti on käytettävä vähintään kuusi rinnakkaistestauskammiota (ks. lisäys 7). Lisääntymisvaiheen aikana (F0-sukupolvea lukuun ottamatta) rinnakkaisnäyterakenne kaksinkertaistetaan fekunditeetin arviointia varten, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi lisääntyvä pari (ks. 42 kohta).
24. Testipitoisuuksien lisäksi on tehtävä laimennusvesikontrolli ja tarvittaessa liuotinkontrolli. Kontrolleissa on käytettävä kaksinkertaista määrää rinnakkaisnäytekammioita, jotta varmistetaan riittävä tilastollinen voima (ts. kontrolleissa on oltava vähintään 12 rinnakkaisnäytettä). Lisääntymisvaiheessa kontrollien rinnakkaisnäytteiden määrä kaksinkertaistetaan (ts. vähintään 24 rinnakkaisnäytettä, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi kuteva pari). Lisääntymisen jälkeen kontrollirinnakkaisnäytteissä saa olla enintään 20 alkia (kalaa).

MENETTELY

Testin aloittaminen

25. Ne lisääntymisaktiiviset aikuiset kalat, joita käytetään testin F0-sukupolven luomisessa, valitaan kahdella kriteerillä, jotka ovat ikä (yleensä yli 12 viikkoa mutta ei mielellään yli 16:ta viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) ja paino (pitää olla naarailla ≥ 300 mg ja koirilla ≥ 250 mg).
26. Nämä spesifikaatiot täyttävät naaras-koirasparit siirretään yksittäisinä pareina kuhunkin rinnakkaisnäytteenä toimivaan säiliöön. Testin alkaessa kontrolleissa on oltava 12 rinnakkaisnäytettä ja kemikaalikäsittelyissä kuusi. Nämä säiliöt jaetaan satunnaisesti käsittelyyn (ts. T1–T5 ja kontrolli) ja rinnakkaisnäytteisiin (ts. kontrollit A–L ja altistukset A–F), ja ne liitetään altistusjärjestelmään, jossa on asianmukainen virtaus jokaiseen säiliöön.

Altistumisolosuhteet

27. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista ja -olosuhteista on lisäyksessä 3. Kun näitä spesifikaatioita noudatetaan, kontrollikalojen osalta päätetapahtumien arvojen tulisi olla lisäyksessä 4 lueteltujen mukaiset.
28. Testin aikana on mitattava liuennut happi, pH ja lämpötila vähintään yhdestä testiastiasta jokaisessa käsittelyryhmässä ja kontrollissa. Lämpötilaa lukuun ottamatta nämä mittaukset on tehtävä vähintään kerran viikossa altistusjakson ajan. Keskimääräinen veden lämpötila on oltava 24–26 °C testin ajan ja koko tutkimuksen keston ajan. Altistusjaksolla lämpötila on mitattava joka päivä. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin $\pm 0,5$ pH-yksikköä. Käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

Altistusaika

29. Testissä altistetaan sukukypsät kalat F0-sukupolvesta kolmen viikon ajaksi. Viikolla 4, suurin piirtein testipäivänä 24, luodaan sukupolvi F1 ja F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin (ks. 34 kohta). Tämän jälkeen F1-sukupolvi altistetaan vielä 14 viikon ajaksi (F1-sukupolven altistusaika on siis yhteensä 15 viikkoa) ja F2-sukupolvi kahdeksi viikoksi kuoriutumiseen saakka. Testin kokonaiskesto on yleensä 19 viikkoa (ts. F2-sukupolven kuoriutumiseen saakka). Testin aikajanat ovat taulukossa 2, ja niitä on selostettu tarkemmin lisäyksessä 9.

Ruokinta

30. Kaloja voidaan ruokkia suolalehtijalkaisilla (*Artemia* spp.) (24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla) *ad libitum*, ja lisäksi niille voidaan antaa kaupallisesti saatavilla olevaa hiutaleruokaa tarvittaessa. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta (esimerkiksi orgaanisia klooriyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet, polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet), polyklorinoidut bifenyylit (PCB-yhdisteet)). Sellaista ruokaa, joka sisältää tavallista enemmän endokriinisesti aktiivisia aineita (kuten fytoestrogeeneja), on vältettävä, koska ne voivat vaarantaa testin vasteen. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet on poistettava testiastioista tarvittaessa; kunkin säiliön pohja on puhdistettava huolellisesti esimerkiksi käyttämällä lappoa. Myös kunkin säiliön seinät ja pohja on puhdistettava kerran tai kahdesti viikossa (esimerkiksi lastalla pyyhkimällä). Lisäyksessä 5 on esimerkki ruokinta-aikataulusta. Ruokintatiheys määräytyy sen mukaan, montako kalaa kussakin rinnakkaisnäytteessä on. Näin ollen ruokintatiheyttä harvennetaan, jos rinnakkaisnäytteestä kuolee kaloja.

Analyttiset määritykset ja mittaukset

31. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemikaalin stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten vähintään joka viikko jokaisen käsittelyryhmän yhdestä rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko.
32. Lisäksi testin aikana on seurattava laimennus- ja varastoliuoksen virtausnopeutta sopivin väliajoin (kuitenkin vähintään kolme kertaa viikossa). Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Jos kemikaalit ovat sellaisia, että ne kertyvät kaloihin selvästi, testipitoisuuksia voidaan pienentää kalojen kasvaessa. Tällöin on myös suositeltavaa mukauttaa testiliuoksen vaihtumisnopeutta jokaisessa kammiossa, jotta testipitoisuudet pysyvät mahdollisimman vakaina.

Havainnot ja mitattavat päätetapahtumat

33. Mitattavia päätetapahtumia ovat fekunditeetti, hedelmällisyys, kuoriutuminen, kasvu ja eloonjääneisyys, ja niiden avulla arvioidaan mahdollisia populaatiotason vaikutuksia. Myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Muita mekanistisia päätetapahtumia ovat maksan vitellogeniinin mRNA:n tai vitellogeniiniproteiinin arvot, jotka mitataan immunomäärityksellä (28), fenotyyppisen sukupuolen tunnusmerkit, kuten koiraille tunnusomaiset peräevän papillit, sukurauhasten histologinen arviointi sekä munuaisten, maksan ja sukurauhasten

histopatologinen arviointi (ks. päätetapahtumaluettelo taulukosta 1). Kaikki nämä päätetapahtumat arvioidaan kalayksilön geneettisen sukupuolen määrittämisen valossa sen perusteella, onko kalalla medakan koirassukupuolen määrittävä geeni *dmy* vai ei (ks. 41 kohta). Myös kutemisaika arvioidaan. Lisäksi voidaan johtaa yksinkertaiset fenotyypin sukupuolen osuudet peräeväpapillien määrää koskevien tietojen perusteella: näin yksittäinen medaka voidaan määrittää fenotyypiltään joko koiraaksi tai naaraaksi. Tällä testimenetelmällä ei havaita vähäisiä poikkeamia odotuksenmukaisesta sukupuolten suhteesta: kalojen määrä rinnakkaisnäytteissä on melko pieni, eikä siitä saada riittävästi tilastollista voimaa. Histopatologisen arvioinnin aikana tutkitaan myös sukurauhaset ja tehdään tavallista paljon todistusvoimaisempia analyyseja sukurauhasten fenotyypin arviointia varten geneettisen sukupuolen valossa.

34. Tämän testimenetelmän ensisijainen tarkoitus on arvioida, onko testikemikaalilla mahdollisia populaation kannalta merkityksellisiä vaikutuksia. Mekanistisista päätetapahtumista (VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasiin kohdistuvat histopatologiset vaikutukset) voi olla apua sen määrittämisessä, välittyykö jokin vaikutus mahdollisesti hormonitoiminnan kautta. Systeemiset ja muunlaiset toksisuudet voivat kuitenkin vaikuttaa mekanistisiin päätetapahtumiin. Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava.

Kalojen humaani lopettaminen

35. Kun F0- ja F1-sukupolvien altistus on päättynyt ja kun poikasista on otettu näytteet, kalat on lopetettava riittävällä määrällä nukutusliuosta (esimerkiksi trikaiinimetäänisulfonaatilla (MS-222, CAS-nro 886-86-2), 100–500 mg/l), joka on puskuroitu NaHCO₃:lla (300 mg/l) (natriumbikarbonaatti, CAS-nro 144-55-8) limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Jos kaloissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissa niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos kala lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta kala lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Mätimunien ja kalanpoikasten käsittely

Mätimunien kerääminen lisääntyviltä pareilta seuraavan sukupolven luomista varten

36. Munat kerätään testiviikon 4 ensimmäisenä päivänä (tai tarvittaessa kahtena ensimmäisenä päivänä), jolloin F0-sukupolvi vaihtuu F1-sukupolveksi, ja testiviikon 18 ensimmäisenä

päivänä, jolloin F1-sukupolvi vaihtuu F2-sukupolveksi. Testiviikko 18 vastaa F1-sukupolvella aikuista kalaa, jonka ikä on 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen. On tärkeää, että kaikki munat poistetaan kaikista säiliöistä päivää ennen kuin munat kerätään, jotta varmistetaan, että kaikki lisääntyvältä parilta kerättävät munat ovat peräisin yhdestä kudusta. Kutemisen jälkeen naarasmedaka kantaa muniaan joskus sukupuoliaukon lähellä, kunnes se voi laskea munat substraattiin. Jos säiliössä ei ole substraattia, munat ovat joko naaraaseen kiinnittyneinä tai säiliön pohjalla. Munien sijainnin mukaan ne joko irrotetaan naaraasta varovasti tai kerätään säiliön pohjalta lapolla F0-sukupolven osalta testiviikolla 4 ja F1-sukupolven osalta testiviikolla 18. Kaikki käsittelysäiliöistä kerätyt munat yhdistetään, ennen kuin ne jaetaan inkubaatiokammioihin.

37. Mätimunia yhdistävät rihmat on poistettava. Jokaiselta lisääntyvältä parilta (1 pari rinnakkaisnäytettä kohti) kerätään hedelmöittyneitä munia (enintään 20), jotka yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti sopiviin inkubaatiokammioihin (lisäys 6, 7). Laadukkaalla dissektiomikroskoopilla voidaan nähdä merkkejä varhaisesta hedelmöittymisestä/kehityksestä. Niitä ovat esimerkiksi korionin muodostuminen, meneillään oleva solun jakautuminen tai rakkulan muodostuminen. Inkubaatiokammiot voidaan laittaa kullekin käsittelylle tarkoitettuihin erillisiin ”inkubaattoriakvaarioihin (jolloin veden laadun parametrit ja testikemikaalien pitoisuudet on mitattava niissä) tai rinnakkaisakvaarioon, jossa säilytetään kuoriutuneita kalanpoikasia (ns. vapaasti liikkuvia alkioita). Jos tarvitaan toinen keräyspäivä (testipäivä 23), kaikki mätimunat kummaltakin päivältä on yhdistettävä ja jaettava sen jälkeen järjestelmällisesti kuhunkin käsittelyrinnakkaisnäytteeseen.

Mätimunien kasvatus kuoriutumiseen saakka

38. Hedelmöittyneitä munia ravistellaan munainkubaattorissa koko ajan esimerkiksi ilmakuplilla tai keinuttamalla inkubaattoria pystysuunnassa. Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (lisäys 9). Ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään seitsemäntenä päivänä hedelmöittymisen jälkeen, jotta hedelmöittyneet munat pääsevät laskeutumaan inkubaattorin pohjalle. Tämä edistää kuoriutumista, joka tapahtuu yleensä parin seuraavan päivän aikana. Jokaisesta käsittely- ja kontrollisäiliöstä lasketaan kuoriutuneet (nuoret kalanpoikaset; vapaasti liikkuvat alkiot) (yhdistetyt rinnakkaisnäytteet). Hedelmöittyneet munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika (yleensä 16 tai 18 päivää hedelmöittymisen jälkeen), katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään.
39. Jokaiseen rinnakkaisnäytesäiliöön siirretään 12 kalanpoikasta. Inkubaatiokammioiden kalanpoikaset yhdistetään ja jaetaan järjestelmällisesti rinnakkaisnäytesäiliöihin (lisäys 7). Tämä voidaan tehdä valitsemalla käsittelyryhmästä kalanpoikanen satunnaisesti ja

lisäämällä sen jälkeen rinnakkaisakvaarioon kalanpoikanen sattumanvaraisesti. Jokaisessa säiliössä on oltava yhtä monta (n=12) kuoriutunutta kalanpoikasta (enintään 20 poikasta / säiliö). Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi täyttämään kaikki käsittelyrinnakkaisnäytteet, kalanpoikaset kannattaa jakaa niin, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 poikasta. Kalanpoikasia voidaan käsitellä turvallisesti isoilla lasipipeteilla. Mahdolliset ylimääräiset kalanpoikaset lopetetaan humanisti nukutusaineella. Lisääntyvien parien muodostamista edeltävän muutaman viikon aikana päivä, jona ensimmäinen kututapahtuma huomataan kussakin rinnakkaisnäytteessä, on merkittävä muistiin.

Lisääntyvien parien lajittelu

Evien leikkaaminen ja genotyyppisen sukupuolen määrittäminen

40. Genotyyppinen sukupuoli määritetään eväleikkeistä viikolla 9–10 hedelmöittymisen jälkeen (ts. F1-sukupolven osalta testiviikoilla 12–13). Kaikki säiliössä olevat kalat nukutetaan (käyttämällä hyväksytyjä menetelmiä, kuten IACUCia), ja jokaiselta kalalta otetaan pyrstöevän selän- tai vatsanpuoleisesta kärjestä pieni kudoksenäyte kyseisen yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämistä varten (29). Rinnakkaisnäytteen kalat voidaan laittaa pieniin häkkeihin (jos mahdollista, yksi kala yhteen häkkiin) rinnakkaisnäytesäiliöön. Kuhunkin häkkiin voidaan laittaa myös kaksi kalaa, jos ne ovat selvästi erotettavissa toisistaan. Yksi keino siihen on leikata pyrstöevä (ts. selän- tai vatsanpuoleinen kärki) eri tavalla kudoksenäytettä otettaessa.
41. Medakan genotyyppinen sukupuoli määritetään tunnistetun ja sekvensoidun, Y-kromosomissa sijaitsevan geenin (*dmy*) perusteella. Jos kalalla on *dmy*-geeni, kyseessä on XY-yksilö, fenotyypistä riippumatta, ja jos *dmy*-geeniä ei ole, kyseessä on XX-yksilö, fenotyypistä riippumatta (30); (31). Jokaisesta eväleikkeestä uutetaan deoksiribonukleiinihappo (DNA), ja *dmy*-geenin olemassaolo tai sen puuttuminen voidaan määrittää polymeraasiketjureaktiomenetelmillä (PCR) (ks. tämän liitteen C.41 luvussa oleva lisäys 9 tai lisäykset 3 ja 4 lähdeviitteessä (29)).

Lisääntyvien parien muodostaminen

42. Genotyypistä sukupuolta koskevia tietoja käytetään lisääntyvien XX-XY-parien muodostamiseen riippumatta niiden ulkoisesta fenotyypistä, jota testikemikaalille altistuminen voi muuttaa. Sinä päivänä, jona kunkin kalan genotyyppinen sukupuoli määritetään, jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan kaksi XX-kalaa ja kaksi XY-kalaa satunnaisesti, ja niistä muodostetaan kaksi lisääntyvää XX-XY-paria. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa, tarvittava kala on otettava muista kemikaalikäsittelyn rinnakkaisnäytteistä. Tärkeintä on, että kaikissa käsittelynäytteissä ja kontroleissa on suositeltu määrä (12 kpl) lisääntyviä pareja (24). Kaloja, joilla on selviä poikkeavuuksia (uimarakkoon liittyviä ongelmia, epämuodostunut

selkäranka, suuria koonvaihteluita jne.), ei tule valita lisääntyviin pareihin. F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa kussakin rinnakkaissäiliössä tulee olla vain yksi lisääntyvä pari.

Poikasvaiheen näytteenotto ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto kaloilta, joita ei käytetä lisääntyvissä pareissa

43. Kun lisääntyvät parit on lajiteltu, kalat, joita ei käytetä lisääntymiseen, lopetetaan humanisti, ja niiltä mitataan poikasvaiheen päätetapahtumat testiviikoilla 12–13 (F1). On hyvin tärkeää, että kaloja käsitellään siten, että lisääntyvien parien valinnassa määritetty kunkin kalayksilön genotyyppinen sukupuoli voidaan aina jäljittää. Kaikki kerättävät tiedot analysoidaan tietyn kalan genotyyppisen sukupuolen perusteella. Jokaiselta kalalta mitataan useita päätetapahtumia: kalanpoikasten eloonjäämisen määrittäminen (testiviikot 7–12/13 (F1)), pituuskasvu (vakiopituus voidaan mitata, jos pyrstöevää on lyhennetty geneettisen sukupuolen analysointiin liittyvässä näytteenotossa). Kokonaispituus voidaan mitata, jos pyrstöevästä on otettu *dmy*-geenin määrittämistä varten näytteeksi vain osa selkä- tai vatsapuolelta. Lisäksi punnitaan paino (märkäpaino ja taputtelemalla kuivatun kalan paino) ja määritetään maksan *vtg*:n mRNA (tai VTG) ja peräevän papillit (ks. taulukot 1 ja 2). Lisääntyvien parien paino- ja pituustietoja tarvitaan myös käsittelyryhmän keskimääräisen kasvun laskemisessa.

Kudosnäytteet ja vitellogeniinin mittaust

44. Maksa dissekoidaan, ja se on säilytettävä ≤ -70 °C:ssa *vtg* mRNA- (tai VTG) -mittauksiin saakka. Kalan pyrstö, myös peräevä, säilötään asianmukaiseen kiinnitysaineeseen (esim. Davidsonin kiinnitysaine) tai valokuvataan siten, että peräevän papillit voidaan laskea myöhemmin. Haluttaessa näytteitä voidaan ottaa myös muista kudoksista (esim. sukurauhasista) ja säilöä samalla. Maksan VTG-pitoisuus on kvantifioitava homologisella ELISA-tekniikalla (ks. medakan osalta suositellut menettelyt tämän liitteen C.48 luvun lisäyksestä 6). Vaihtoehtoisesti *vtg*:n mRNA:n kvantifioinnissa (ts. *vtg* I -geenin mRNA:n uuttaminen maksanäytteestä ja sen kopioiden lukumäärän laskeminen (yksikössä ng kokonais-mRNA:sta) kvantitatiivisella PCR:llä) voidaan käyttää Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston EPA:n kehittämiä menetelmiä (29). Siihen nähden, että määritetään *vtg*-geenin kopioiden lukumäärä kontrolli- ja käsittelyryhmistä, vähemmän resursseja vievä ja teknisesti helpompi menetelmä on määrittää *vtg* I:n suhteellinen muutos (kerroin) kontrolli- ja käsittelyryhmissä.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

45. Normaaleissa olosuhteissa vain sukukypsillä koirasmedakoilla on papilleja, jotka kehittyvät peräevän tiettyjen ruotojen liitoslevyihin sekundaarisina sukupuoliominaisuuksina, ja ne ovat mahdollinen biomarkkeri hormonaalisille haittavaikutuksille. Peräeväpapillien (papillien lukumäärä liitoslevyineen)

laskentamenetelmä esitetään lisäyksessä 8. Peräeväpapillien lukumäärää käytetään myös luokiteltaessa kyseinen yksilö ulkoisesti fenotyyppiseksi koiraaksi tai naaraaksi, kun lasketaan yksinkertainen sukupuolten välinen suhde yhtä rinnakkaisnäytettä kohti. Medaka, jolla on yksikin papilli (enemmän kuin 0), määritetään koiraaksi, kun taas medaka, jolla ei ole yhtään (0) peräeväpapillia, määritetään naaraaksi.

Fekunditeetin ja hedelmällisyyden arviointi

46. Fekunditeettia ja hedelmällisyyttä arvioidaan F0-sukupolven osalta testiviikoilla 1–3 ja F1-sukupolven osalta testiviikoilla 15–17. Kultakin lisääntyvältä parilta kerätään munat 21 peräkkäisenä päivänä. Munat otetaan haavissa olevilta naarailta varovasti ja/tai lapolla akvaarion pohjalta joka aamu. Tiedot jokaisen rinnakkaisnäytteen lisääntyvän parin fekunditeetista ja hedelmällisyydestä kirjataan päivittäin. Fekunditeetti määritellään kutuvaiheessa laskettujen mätimunien määräksi, ja hedelmällisyys määritellään toiminnallisesti hedelmöittyneiden ja elinkykyisten munien määräksi laskentahetkellä. Määrät on laskettava mahdollisimman pian munien keräämisen jälkeen.
47. Rinnakkaisnäytteen fekunditeetti kirjataan päivittäin yhden lisääntyvän parin munien määränä, ja se analysoidaan suositelluilla tilastomenetelmillä rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja käyttäen. Rinnakkaisnäytteen hedelmällisyys on lisääntyvän parin tuottamien hedelmöittyneiden munien määrän summa jaettuna kyseisen parin tuottaminen munien määrän summalla. Tilastollisesti hedelmällisyys analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena. Rinnakkaisnäytteiden kuoriutuvuus on kalanpoikasten lukumäärä jaettuna testiin otettujen alkioden lukumäärällä (yleensä 20). Tilastollisesti kuoriutuvuutta analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena.

Näytteenotto täysikasvuisilta kaloilta ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto lisääntyvien parien kaloilta

48. Testiviikon 17 jälkeen (kun F2-sukupolvi on saatu luotua onnistuneesti) F1-sukupolven täysikasvuiset kalat lopetetaan humanisti, ja niiltä mitataan eri päätetapahtumat (ks. taulukot 1 ja 2). Peräevä kuvataan peräeväpapillien arviointia varten (ks. lisäys 8), ja/tai pyrstö poistetaan heti sukupuoliaukon takaa ja kiinnitetään kiinnitysaineella, jotta papillit voidaan laskea myöhemmin. Pырstöevästä voidaan ottaa osa näytteeksi ja laittaa se talteen geneettisen sukupuolen (*dmy*) vahvistamista varten, jos se on tarpeen. Tarvittaessa voidaan ottaa kudoksenäyte *dmy*-analyysin toistamista varten tietyn kalan geneettisen sukupuolen vahvistamiseksi. Kalan ruumiin ontelo avataan, jotta asianmukaiset kiinnitysaineet (esim. Davidsonin aine) pääsevät tunkeutumaan kudoksiin, ennen kuin koko kala upotetaan kiinnitysaineeseen. Jos ennen kiinnittämistä tehdään asianmukainen permeabilisointivaihe, ruumiin ontelo ei tarvitse avata.

Histopatologia

49. Jokaisesta kalasta tutkitaan histologisesti sukurauhaskudoksen patologia (30); (29). Kuten 33 kohdassa on todettu, systeemiset tai muunlaiset toksisuudet voivat vaikuttaa muihin tässä testissä arvioitaviin mekanistisiin päätetapahtumiin (ts. VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasten histopatologiset vaikutukset). Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava. Suurimman pitoisuuden käsittelyryhmän (kontrolliin verrattuna) ja sen ryhmän välinen vertailu, jossa vaikutuksia ei havaittu, voidaan tehdä, mutta sen osalta suositellaan tutustumaan histopatologisia tutkimuksia koskeviin ohjeisiin (29). Yleensä kaikki näytteet käsitellään/valmistellaan ensin, minkä jälkeen patologi tutkii ne. Jos käytetään vertailuun perustuvaa lähestymistapaa, on muistettava, että Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) -menettelyssä oletetaan, että kun annoksen suuruus kasvaa, myös biologinen vaikutus (patologia) voimistuu. Testin selitysvoima siis heikkenee, jos siinä tarkastellaan vain yhtä suurta annosta eikä ollenkaan keskisuuria annoksia. Jos tilastoaalyyseia ei tarvita sen määrittämiseksi, ettei suurella annoksella ole vaikutusta, tämä lähestymistapa voi olla hyväksyttävä. Sukurauhasten fenotyyppi johdetaan myös tämän arvioinnin perusteella.

Muut havainnot

50. Tästä tutkimuksesta saadaan tietoja, joita voidaan käyttää (esimerkiksi näyttöön perustuvassa lähestymistavassa) vähintään näiden kahden, lisääntymiskyvyn heikentymiseen johtavan yleisen haittavaikutusreitin samanaikaisessa arvioinnissa: a) hormonivälitteiset reitit, joihin liittyy hypothalamus-aivolisäke-sukurauhasakselin häiriintyminen, ja b) reitit, jotka lyhentävät elinaikaa ja vähentävät kasvua (pituus ja paino). Lisäksi voidaan arvioida muun kuin hormonivälitteisen toksisuuden vaikutuksia lisääntymiseen. Tähän testiin sisältyy myös päätetapahtumia, joita yleensä arvioidaan pitkäaikaisissa toksisuustesteissä (täyden elinkaaren testi ja varhaisen elinvaiheen testi), ja niiden avulla voidaan arvioida vaaroja, joita aiheuttavat sekä muut kuin hormonivälitteiset toksiset vaikutustavat että hormonivälitteisen toksisuuden reitit. Testin aikana myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Lisäksi on kirjattava kaikki kuolleet ja eloonjääneet kalat niiden karsintaan saakka (testiviikko 6/7), elossa olevat kalat karsinnan jälkeen poikasvaiheen näytteenottoon saakka (hedelmöittymisen jälkeinen viikko 9–10) ja elossa olevat kalat kutemisesta täysikasvuisten kalojen näytteenottoon saakka on laskettava.

Taulukko 1: Yhteenveto MEOGRT-testin päätetapahtumista*

Elinkaaren vaihe	Päätetapahtuma	Sukupolvi
------------------	----------------	-----------

Alkio (hvj 2)	Kuoriutuminen (% ja kuoriutumisaika)	F1, F2
Juveniili (hvj 4)	Eloonjääneisyys	F1
Poikanen (hvj 9 tai 10)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	
	Vitellogeniini (mRNA tai proteiini)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Ulkoisen sukupuolen suhde	
	Aika ensimmäiseen kutuun	
Aikuinen (hvj 12–14)	Lisääntyminen (fekunditeetti ja hedelmällisyys)	F0, F1
Aikuinen (hvj 15)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Histopatologia (sukurauhaset, maksa, munuaiset)	

*Nämä päätetapahtumat on analysoitavat tilastollisesti.

AIKAJANA

51. Taulukossa 2 on MEORGT-testin aikajana. MEORGT-testissä F0-sukupolven aikuisten altistus kestää neljä viikkoa, F1-sukupolven altistus kestää 15 viikkoa, ja F2-sukupolven altistusaika kestää kuoriutumiseen saakka (hvj 2). Lisäyksessä 9 on yhteenveto MEORGT-testin aikana tehtävistä toimista.

Taulukko 2: MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien mittaamisen aikajana

MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien aikajana																
F0	1	2	3	4												
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

F2																		1	2											
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19											
Elinkaaren tunniste					Alkio					Ruskuaispussipoikaset					Juveniili					Poikanen					Aikuinen					
Päätetapahtumat																														
Fekunditeetti	F ₀															F ₁					• Testissä on 7 rinnakkaisnäyteryhmää ○ 5 ryhmää testikemikaalikäsittelyille ○ 2 ryhmää kontrollikäsitellyille (4, jos käytetään liuotinta) • Ryhmän rakenne ○ 12 rinnakkaisnäytettä lisääntymisen, aikuisten patologian ja SSO:n tutkimiseen (vkt 10–18) ○ 6 rinnakkaisnäytettä kuoriutumisen, eloonjäämisen, vtg:n ja poikasten SSO:n ja kasvun tutkimiseen (vkt 1–9)									
Hedelmällisyys	F ₀															F ₁														
Kuoriutuminen					F ₁															F ₂										
Eloonsäännöisyys						F ₁						F ₁							F ₁											
Kasvu				F ₀								F ₁							F ₁											
Vitellogeniini												F ₁																		
Sekundaarinen sukupuoli												F ₁							F ₁											
Histopatologia																			F ₁											
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	SSO: sekundaariset sukupuoliominaisuudet; vkt: viikot; vtg: vitellogeniini										

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

52. Koska genotyyppinen sukupuoli määritetään kaikilta testikaloilta, tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen (ts. XY: koiraat ja XX: naaraat). Jos näin ei tehdä, kaikkien analyysien tilastollinen voima heikkenee tuntuvasti. Aineiston tilastollisissa analyyseissa on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu OECD:n julkaisussa *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32). Lisäyksessä 10 on muita ohjeita tilastollisista analyyseista.
53. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC-arvo (32). Se, miten oleelliset vaikuttavat pitoisuudet ja parametrit pitää ilmoittaa, voi vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Jokaisesta päätetapahtumasta on määritettävä prosentuaalinen muutos, joka on tärkeää havaita tai arvioida. Koesuunnitelma on mukautettava siten, että se on mahdollista. Ei ole todennäköistä, että sama prosentuaalinen muutos koskisi kaikkia päätetapahtumia. Ei ole myöskään todennäköistä, että voitaisiin suunnitella toteutuskelpoinen testi, joka täyttäisi nämä kriteerit kaikkien päätetapahtumien osalta, joten on tärkeää keskittyä niihin päätetapahtumiin, jotka ovat kussakin kokeessa tärkeitä, jotta se voidaan suunnitella

asianmukaisesti. Lisäyksessä 10 on malli tilastollisesta vuokaaviosta ja ohjeet, jotka on tarkoitettu avuksi aineiston käsittelyyn ja sopivimman tilastollisen testin tai mallin valintaan. Muitakin tilastomenetelmiä saa käyttää, jos ne ovat tieteellisesti perusteltavissa.

54. Variaatiot on analysoitava kussakin rinnakkaisnäytesarjassa varianssianalyysillä tai kontingenssitaulukkomenetelmillä, ja analyysiin perustuvia riittävän asianmukaisia tilastollisia analyysimenetelmiä on käytettävä. Jotta voidaan tehdä useita vertailuja yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien tulosten välillä, jatkuvien vasteiden osalta on suositeltavaa käyttää askeltavaa menetelmää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testiä). Jos tiedot eivät ole yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, tulee käyttää Dunnettin testiä tai Dunnin testiä (tarvittaessa tietojen asianmukaisen muuntamisen jälkeen).
55. Fekunditeetin osalta mätimunien määrä lasketaan päivittäin, mutta ne voidaan analysoida kokonaismäärinä tai toistuvana mittauksena. Lisäyksessä 10 on tarkempia tietoja siitä, miten tämä päätetapahtuma analysoidaan. Sellaisia histopatologisia tietoja varten, jotka esitetään vakavuuspisteinä, on kehitetty uusi tilastollinen testi, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Kaikki kemikaalikäsittelyissä havaitut päätetapahtumat, jotka poikkeavat asianmukaisista kontrolleista huomattavasti, on ilmoitettava.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden käsittelytasojen käyttö

57. Useita tekijöitä otetaan huomioon, kun määritetään, esiintyykö rinnakkaisnäytteessä tai koko käsittelyssä selvää toksisuutta, jolloin ne tulisi poistaa analyysistä. Selväksi toksisuudeksi määritellään >4 kuolemantapausta missä tahansa näytteessä kolmannen ja yhdeksännen hjv:n välillä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Muita selvän toksisuuden merkkejä ovat verenvuoto, epänormaali käyttäytyminen, epänormaalit uintikuviot, ruokahaluttomuus ja muut sairaudesta kertovat kliiniset merkit. Subletaalin toksisuuden merkkien osalta laadulliset arvioinnit voivat olla tarpeen, ja niissä on otettava aina huomioon laimennusveden kontrolliryhmä (pelkkä puhdas vesi). Jos suurimman pitoisuuden käsittelyssä (käsittelyissä) esiintyy selvää toksisuutta, on suositeltavaa jättää nämä käsittelyt pois analyysistä.

Liuotinkontrollit

58. Liuottimen käyttöä on harkittava vasta viimesijaisena keinona, kun kaikki muut kemikaalin annosteluvaihtoehdot on kokeiltu. Jos liuotinta käytetään, sen kanssa on käytettävä laimennusvesikontrollia. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset.

Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissä huomioon otettavat päätapahtumat ovat kasvuparametrit (paino), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

Testiraportti

59. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali: fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

- kemialliset tunnistetiedot.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

- ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet
- kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

- mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

- tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

Testiolosuhteet:

- valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)
- testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteidien lukumäärä, kuoriutuneiden munien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

- varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)
- testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumpput, laimennusjärjestelmät)
- menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia aidossa liuoksessa
- laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset
- nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat
- testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus
- yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

- todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit
- seuraavat tiedot kontrolliryhmistä (myös liuotinkontrollista, jos se oli käytössä) ja käsittelyryhmistä: F1- ja F2-sukupolven kuoriutuminen (kuoriutuvuus ja kuoriutumisaika); F1-sukupolvelta kuoriutumisen jälkeinen eloonjääneisyys, kasvu (pituus ja paino), genotyyppinen sukupuoli ja sukupuolten erottelu (esim. sekundaariset sukupuoliominaisuudet peräeväpapillien ja sukurauhasten histologian perusteella), fenotyyppinen sukupuoli, sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit), vtg:n mRNA (tai VTG-proteiini), histopatologinen tutkimus (sukurauhaset, maksa ja munuaiset); F0- ja F1-sukupolvelta lisääntymistiedot (fekunditeetti ja hedelmällisyys); (ks. taulukot 1 ja 2).
- tilastollinen analyysimenetelmä (regressio- tai varianssianalyysi) ja tietojen käsittelymenetelmä (käytetyt tilastolliset testit tai mallit)
- pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä
- pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä ($p = 0,05$) tarvittaessa EC_x kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet

- mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.

60. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1–36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925–1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552–2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692–1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487–1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to

- 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288–295.
- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78–86.
- (11) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11–23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Saatavana osoitteessa <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593–599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287–1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330–338.

- (20) Tämän liitteen C.15 luku Kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä lyhytaikainen myrkyllisyystesti
- (21) Tämän liitteen luku C.37, 21 päivän mittainen seulontatutkimus kaloilla: Lyhytaikainen estrogeeni- ja androgeeniaktiivisuuteen sekä aromataasin estoon kohdistuva seulonta
- (22) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi
- (23) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus
- (24) Tämän liitteen C.47 luku, Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheessa
- (25) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613–619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali: Aine tai seos.

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

Fekunditeetti = mätimunien lukumäärä

Hedelmällisyys = elinkykyisten mätimunien lukumäärä / fekunditeetti

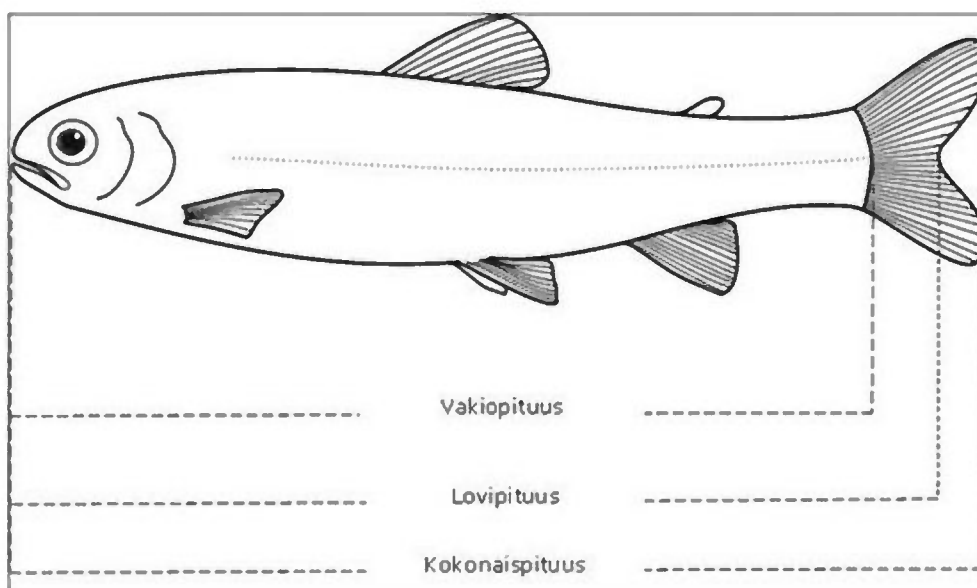
Lovipituus tarkoittaa kalan pituutta leuan kärjestä pyrstöevän keskimmäisten ruotojen kärkeen, ja sitä käytetään kaloilla, joilta on vaikea määrittää selkärangan päättymiskohtaa (www.fishbase.org)

Kuoriutuvuus = kuoriutuneet kalanpoikaset / inkubaattoriin laitettujen alkioiden määrä

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee, eläinten hoitoa ja käyttöä käsittelevä komitea

Vakiopituus tarkoittaa kalan pituutta mitattuna leuan kärjestä viimeisen nikaman takareunaan tai pyrstönikamien keskiosan takareunaan. Yksinkertaistettuna tästä mittauksesta jätetään pyrstöevän pituus pois. (www.fishbase.org)

Kokonaispituus tarkoittaa pituutta leuan kärjestä pyrstöevän pitemmän lohkon kärkeen; mitataan yleensä siten, että lohkot on puristettu keskilinjaa vasten. Kyseessä on suoran viivan mittaus, ruumiin kaarevuutta ei oteta mukaan (www.fishbase.org).



Kuva 1: Kuvaus käytetyistä eri pituuksista

EC_x: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC₅₀ on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

Läpivirtauskoe on testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistuksen keston ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

Kalatiheys: Kalojen märkäpaino suhteessa vesimäärään.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Lisäyksissä 5 ja 6 on ohjeita tästä.

Mediaani tappava pitoisuus (LC₅₀): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Lastaustiheys: Kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

VHJ: Viikkoa hedelmöittymisen jälkeen

Lisäys 2**JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISTIA OMINAISUUKSIA**

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyyliden 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**MEOGRT-TESTIN TESTIOLOSUHTEET**

- | | |
|--|---|
| 1. Suositeltu laji | Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Testityyppi | Jatkuva läpivirtaus |
| 3. Veden lämpötila | Testin nimellislämpötila on 25 °C. Keskimääräisen lämpötilan on oltava jokaisessa säiliössä 24–26 °C koko testin ajan. |
| 4. Valaistus | Loisteputket (laajakirjoiset ja ~150 luumenia / m ²) (~150 luksia).

16 h valoisaa : 8 h pimeää |
| 6. Lastaustiheys | F0: 2 aikuista / rinnakkaisnäyte; F1: aloitus enintään 20 munalla (alkiolla) / rinnakkaisnäyte; vähennetään 12 alkioon / rinnakkaisnäyte kuoriutumisen yhteydessä ja sen jälkeen kahteen aikuiseen (lisääntyvä XX–XY-pari) hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 9–10 lisääntymisvaihetta varten |
| 7. Testikammion käytettävissä oleva vähimmäistilavuus | 1,8 l (testikammion koko esimerkiksi: 18 x 9 x 15 cm) |
| 8. Testiliuosten vaihto | Vähintään 5 ja enintään 16 vaihtoa päivässä (tai virtaus 20 ml/min) |
| 9. Testiorganismien ikä testin alkaessa | F0: > 12 vhj, ei kuitenkaan yli 16 vhj |
| 10. Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä | F0: 2 kalaa (1 pari, koiras ja naaras) F1: Enintään 20 kalaa (munaa) / rinnakkaisnäyte (F0- ja F1-sukupolven lisääntyvien parien tuottamia) |
| 11. Käsittelyjen lukumäärä | 5 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t) |
| 12. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä | Vähintään 6 rinnakkaisnäytettä kussakin testikemikaalikäsittelyssä ja vähintään 12 rinnakkaisnäytettä kontrollissa ja liuotinkontrollissa, jos sitä käytetään (rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kaksinkertaistetaan F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa) |
| 13. Organismien lukumäärä kussakin testissä | F0: vähintään 84 kalaa, F1: 504 kalaa (Jos liuotinkontrollia käytetään: F0:ssa 108 kalaa ja F1:ssä 648 kalaa.) Laskettava yksikkö on vapaasti liikkumisvaiheen jälkeinen alkio. |
| 14. Ruokinta | Kaloja ruokitaan suolalehtijalkaisten (<i>Artemia</i> spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla <i>ad libitum</i> . Tarvittaessa kaloille voidaan antaa lisäksi kaupallisesti saatavaa hiutaleruokaa. (Lisäyksessä 6 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä |

	kasvu ja kehitys.)
15. Ilmastus	Ei tarvita, ellei liuennan hapen pitoisuus ilman kyllästysarvosta ole <60 %
16. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai deklloorattu hanavesi.
17. Altistusaika	Ensisijaisesti 19 viikkoa (F0:sta F2:n kuoriutumiseen)
18. Biologiset päätetapahtumat (ensisijaiset)	Kuoriutuvuus (F1 ja F2); eloonjääneisyys (F1, kuoriutumisesta hjv 4 (ruskuaispussipoikasvaiheen loppu/juveniilivaiheen alku), 4–9 (tai 10) hjv (juveniilivaiheen ja poikasvaiheen alku) ja 9–15 hjv (poikasesta aikuisen lopettamiseen asti)); kasvu (F1, pituus ja paino hjv:lla 9 ja 15); sekundaariset sukupuoliominaisuudet (F1, peräeväpapillit hjv:lla 9 ja 15); vitellogeniini (F1, <i>vtg</i> mRNA tai VTG-proteiini hjv:lla 15); fenotyyppinen sukupuoli (F1, sukurauhasten histologian perusteella hjv:lla 15) lisääntyminen (F0 ja F1, fekunditeetti ja hedelmällisyys 21 päivän ajan); kutemisaika (F1); ja histopatologia (F1, sukurauhaset, maksa ja munuaiset hjv:lla 15).
19. Testin validiteettikriteerit	Liuennan hapen pitoisuus ≥ 60 % ilman kyllästysarvosta; keskimääräinen veden lämpötila 24–26 °C koko testin ajan; onnistunut lisääntyminen ≥ 65 %:lla naaraista kontrollissa (kontrolleissa); päivittäinen fekunditeetti keskimäärin ≥ 20 munaa kontrollissa (kontrolleissa); kuoriutuvuus ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) kontrolleissa (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2); eloonjääneisyys kuoriutumisen jälkeen hjv:lle 3 ≥ 80 % (keskiarvo) ja siitä eteenpäin sukupolven lopettamiseen saakka hjv:lle 3 ≥ 90 % (keskiarvo) kontrolleissa (F1); testikemikaalin pitoisuuksien liuoksessa olisi oltava hyväksyttävästi ± 20 % keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Lisäys 4

KONTROLLIEN TYYPILLISIÄ ARVOJA KOSKEVIA OHJEITA

On syytä todeta, että nämä kontrolliarvot perustuvat vain muutamaaan validointitutkimukseen, ja niitä mahdollisesti muutetaan myöhemmin kokemuksen karttuessa.

Kasvu

Kaikilta kaloilta, joilta otetaan näytteet 9 (tai 10) ja 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen (hvj), mitataan paino ja pituus. Tämän protokollan mukaan odotuksenmukaiset märkäpainot hvj:lla 9 ovat koiraille 85–145 mg ja naarailla 95–150 mg. Odotuksenmukaiset märkäpainot hvj:lla 15 ovat koiraille 250–330 mg ja naarailla 280–350 mg. Vaikka yksittäisen kalan paino voi poiketa näistä viitearvoista huomattavasti, kontrollikalojen keskimääräiset painot, jotka ovat selvästi näiden arvojen ulkopuolella ja etenkin alarajaa pienempiä, viittaavat kuitenkin ruokintaan, lämpötilan hallintaan, vedenlaatuun tai sairauksiin liittyviin ongelmiin tai näiden seikkojen yhdistelmään.

Kuoriutuminen

Kontrolleissa normaali kuoriutuvuus on yleensä noin 90 prosenttia, mutta niinkään pieni arvo kuin 80 prosenttia ei ole epätavallinen. Jos kuoriutuvuus on alle 75 prosenttia, se voi olla merkki siitä, että kehittyvien munien ravistelu on ollut riittämätöntä tai että munien käsittely on ollut huolimaton (esimerkiksi kuolleet munat on voitu poistaa liian myöhään, mikä on aiheuttanut sieni-infektion).

Eloojääneisyys

Eloojääneisyys kuoriutumisesta hvj:lle 3 ja sen jälkeen on kontrolleissa yleensä vähintään 90 prosenttia, mutta edes 80 prosentin eloojääneisyys elinkaaren varhaisvaiheessa ei ole vielä hälyttävää kontrolleissa. Sen sijaan on huolestuttavaa, jos eloojääneisyys on kontrolleissa alle 80 prosenttia. Se voi viitata akvaarioiden riittämättömään puhdistukseen, jolloin ruskuaispussipoikaset ovat menehtyneet sairauteen tai ne ovat tukehtuneet, koska liuenneen hapen pitoisuus on ollut liian pieni. Kuolleisuus voi johtua myös säiliön puhdistuksen aikana tapahtuneen vaurioitumisen takia, ja ruskuaispussipoikaset ovat voineet myös joutua sen aikana säiliön vedenpoistojärjestelmään.

Vitellogeniini

Vaikka vitellogeniini (vtg) -geenin absoluuttiset pitoisuudet, jotka ilmaistaan yksikössä kopiota/ng mRNA:n kokonaismäärästä, voivat vaihdella laboratorioden välillä paljonkin käytettyjen menetelysten tai laitteiden vuoksi, vtg-pitoisuuden on oltava noin 200 kertaa suurempi kontrolliryhmän naarailla kuin kontrolliryhmän koiraille. Ei ole epätavallista, jos tämä suhde on 1 000–2 000, mutta alle 200:n oleva suhdeluku on epäilyttävä ja voi viitata näytteen kontaminoitumiseen tai menettelyihin ja/tai käytettyihin reagensseihin liittyviin ongelmiin.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

Koirilla sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien normaalialue, joka määritellään peräeväpapillien eväruotojen segmenttien kokonaismääränä, on 40–80 segmenttiä hjv:lla 9–10. Hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä normaalialue kontrolliryhmän koirilla tulisi olla noin 80–120 ja kontrolliryhmän naarailla 0. Selittämättömistä syistä joskus harvoin on koiraita, joilla ei ole yhtään papillia hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 9 mennessä, mutta koska papillit kehittyvät kaikille kontrolliryhmän koiraille hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä, tämä johtuu mitä todennäköisimmin kehityksen viivästymisestä. Jos kontrolliryhmän naarailla havaitaan papilleja, se osoittaa, että populaatiossa on XX-koiraita.

XX-koiraat

XX-koiraiden normaali taustaesiintyvyys viljelmässä on noin 4 prosenttia tai vähemmän 25 ° C:n lämpötilassa. Esiintyvyys kuitenkin kasvaa lämpötilan noustessa. On syytä huolehtia siitä, että XX-koiraiden osuus populaatiossa pysyy mahdollisimman pienenä. Koska XX-koiraiden esiintyvyydessä vaikuttaa olevan geneettinen komponentti, jonka takia se on periytyvää, kantaviljelmän valvonta ja sen varmistaminen, ettei XX-koiraita käytetä kantaviljelmän kasvattamiseen, ovat tehokkaita keinoja vähentää XX-koiraiden esiintyvyyttä populaatiossa.

Kuteminen

Kontrollirinnakkaisnäytteistä on seurattava kutemista päivittäin ennen fekunditeetin arvioimista. Kontrollipareista voidaan arvioida laadullisesti, onko kutemisesta merkkejä. Arviointi voidaan tehdä silmämääräisesti. Useimpien kontrolliparien pitäisi kutea hjv:lle 12–14 mennessä. Jos kutevia pareja on noina viikkoina vähän, kaloilla voi olla mahdollisia terveyteen, kypsytyteen tai hyvinvointiin liittyviä ongelmia.

Fekunditeetti

Terveet ja hyvin ruokitut 12–14 hjv:n ikäiset medakat kutevat yleensä päivittäin ja tuottavat 15–50 mätimunaa päivässä. Lisääntyvien kontrolliparien suositeltu määrä on 24, ja tästä määrästä 16 parin (> 65 %) pitäisi tuottaa yli 20 munaa päivässä paria kohti (mutta ne voivat kuitenkin tuottaa jopa 40 munaa päivässä). Jos munien määrä on tätä pienempi, kutevat parit saattavat olla epäkypsiä, aliravittuja tai sairaita.

Hedelmällisyys

Kutevien kontrolliparien hedelmöittyneiden munien prosentuaalinen osuus on yleensä 90 prosentin luokkaa, eivätkä myöskään 95 prosentin paikkeilla olevat tai sitä suuremmat arvot ole epätavallisia. Jos kontrolliparien hedelmöittyneiden munien osuus on alle 80 prosenttia, on aihetta epäillä, että kalayksilöt eivät ole terveitä tai että kasvatusolosuhteet eivät ole ihanteelliset.

Lisäys 5

ESIMERKKI RUOKINTA-AIKATAULUSTA

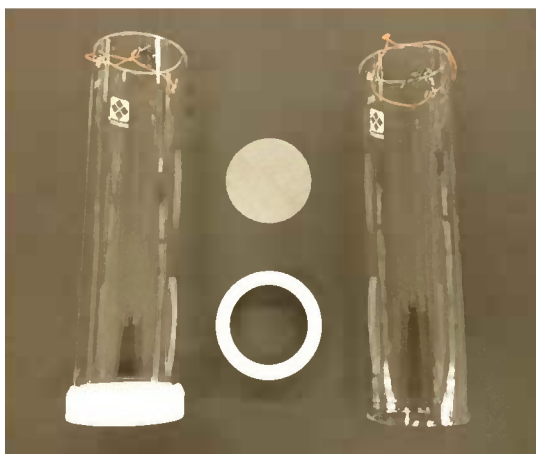
Taulukossa 1 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä kasvu ja kehitys. Tästä aikataulusta saa tarvittaessa poiketa, mutta on suositeltavaa, että poikkeavien aikataulujen yhteydessä varmistetaan, että hyväksyttävää kasvua ja lisääntymistä on havaittavissa. Jotta ehdotettua ruokinta-aikataulua voidaan noudattaa, suolalehtijalkaisten kuivapaino niiden liemen tilavuuteen nähden on määritettävä ennen testin aloittamista. Se voidaan tehdä punnitsemalla tietty määrä suolalehtijalkaisten lientä, jota on kuivattu 24 tunnin ajan 60 °C:ssa ennalta punnituissa astioissa. Jotta voidaan ottaa huomioon liemessä olevien suolojen paino, on kuivattava ja punnittava sama määrä suolaliuosta kuin liemessä on käytetty, ja paino on vähennettävä kuivatun suolalehtijalkaisliemen painosta. Vaihtoehtoisesti suolalehtijalkaisliemi voidaan suodattaa ja huuhdella tislattulla vedellä ennen kuivaamista, jolloin ei tarvitse punnita ”pelkän suolan” painoa. Näitä tietoja käytetään taulukon tietojen muuntamisessa suolalehtijalkaisliemen kuivapainosta siihen suolalehtijalkaisliemen määrään, joka kullekin kalalle on annettava. Lisäksi suositellaan, että suolalehtijalkaisliemestä punnitaan alikvootit viikoittain, jotta varmistetaan, että kaloille annetaan kuivapainoltaan oikea määrä suolalehtijalkaisia.

Taulukko 1: Esimerkki ruokinta-aikataulusta

Aika (kuoriutumisen jälkeen)	Suolalehtijalkaisia (mg kuivapainoa / kala / päivä)
Päivä 1	0,5
Päivä 2	0,5
Päivä 3	0,6
Päivä 4	0,7
Päivä 5	0,8
Päivä 6	1,0
Päivä 7	1,3
Päivä 8	1,7
Päivä 9	2,2
Päivä 10	2,8
Päivä 11	3,5
Päivä 12	4,2
Päivä 13	4,5
Päivä 14	4,8
Päivä 15	5,2
Päivät 16–21	5,6
Viikko 4	7,7
Viikko 5	9,0
Viikko 6	11,0
Viikko 7	13,5
Viikko 8 – lopetus	22,5

Lisäys 8**ESIMERKKEJÄ MUNIEN INKUBOINTIKAMMIOSTA**Esimerkki A

Tämä inkubaattori koostuu katkaistusta lasisesta sentrifugiputkesta, jossa on ruostumatonta terästä oleva holkki ja joka pysyy paikallaan sentrifugin ruuvitulpalla. Tulpan läpi menee ohut lasinen tai ruostumatonta terästä oleva putki, joka ulottuu melkein pyöristettyyn pohjaan asti. Putki puhalttaa varovasti ilmakuplia, joiden tarkoituksena on suspendoida munat, vähentää saprotrofisten sieni-infektioiden kulkeutumista munien välillä ja mahdollistaa kemikaalin virtaus inkubaattorin ja varastosäiliön välillä.

Esimerkki B

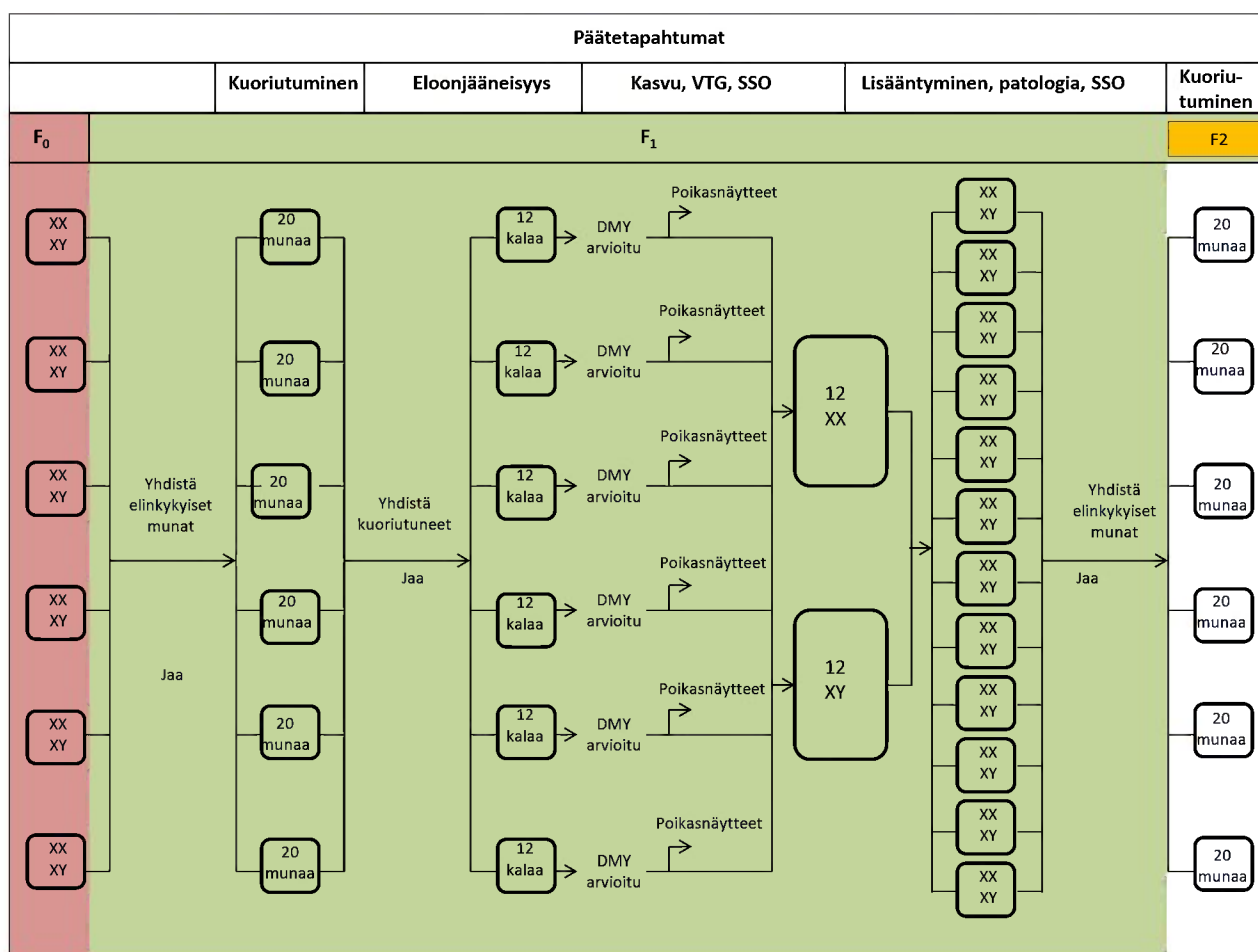


Tämä inkubaattori koostuu lasisesta lieriöstä (halkaisija 5 cm ja korkeus 10 cm) ja ruostumatonta terästä olevasta verkosta ($\varnothing$ 0,25, silmäkoko 32), joka on kiinnitetty lieriön pohjaan PFTE-renkaalla. Inkubaattorit ripustetaan säiliöihin nostorivasta, ja niitä ravistellaan pystysuunnassa (heilahdustaajuus noin 5 cm) medakan munille sopivassa syklissä (yleensä neljän sekunnin välein).

Lisäys 7

KAAVIO RINNAKKAISNÄYTTEIDEN YHDISTÄMISESTÄ JA TÄYTTÄMISESTÄ MEORGT-TESTIMENETELMÄN YHTEYDESSÄ

Kuva 1: Rinnakkaisnäytteiden yhdistäminen ja täyttäminen MEOGRT-testissä Kuvassa esitetään yksi käsittely tai puolikas kontrollista. Yhdistämisen takia rinnakkaisnäytteen identiteetti ei ole sama koko testin ajan. Ilmauksella ”munat” tarkoitetaan elinkykyisiä hedelmöittyneitä munia (eli alkioita).



Käsittelyt ja rinnakkaisnäytteet

Testimenetelmässä suositellaan viittä testikemikaalikäsittelyä, joissa käytetään teknisen laadun kriteerit täyttävää materiaalia, ja negatiivista kontrollia. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä ei pysy samana koko MEOGRT-testin ajan, ja kontrollikäsittelyssä on kaksinkertainen määrä rinnakkaisnäytteitä yhteen testikemikaalikäsittelyyn verrattuna. F₀-sukupolvessa jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on kuusi rinnakkaisnäytettä, ja negatiivisessa kontrollikäsittelyssä on 12 rinnakkaisnäytettä.

Liuottimien käyttöä ei suositella, mutta jos niitä käytetään, MEORGT-testiraportissa on esitettävä perustelut sekä liuottimen käytölle että tietyn liuottimen valinnalle. Lisäksi tarvitaan kahdenlaisia kontroleja, jos liuotinta käytetään: a) liuotinkontrolli ja b) negatiivinen kontrolli. Kummankin näistä kahdesta kontrolliryhmästä on koostuttava täydestä määrästä rinnakkaisnäytteitä kaikissa tämän testin aikajanan pisteissä. Tämä rinnakkaisnäyterakenne pysyy samana testiorganismien kehittyessä F1-sukupolvessa (ja F2-sukupolvessa kuoriutumiseen saakka). Aikuisvaiheessa, kun F1-sukupolven lisääntyvät parit on muodostettu, lisääntymisparien rinnakkaisnäytteiden määrä käsittelyä kohti tulisi mieluiten kaksinkertaistaa. Tällöin jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on enintään 12 rinnakkaisnäyteparia ja kontrolliryhmässä 24 paria (ja tarvittaessa toiset 24 rinnakkaisnäyteparia liuotinkontrollissa). F1-parien kudusta peräisin olevien alkuiden kuoriutuminen määritetään samalla rinnakkaisnäyterakenteella kuin F0-parien kudusta peräisin olevien alkuiden yhteydessä, eli testikemikaalikäsittelyä kohti on aluksi kuusi rinnakkaisnäytettä ja kontrolliryhmässä (-ryhmissä) 12.

Lisäys 8

PERÄEVÄPAPILLIEN LASKEMINEN

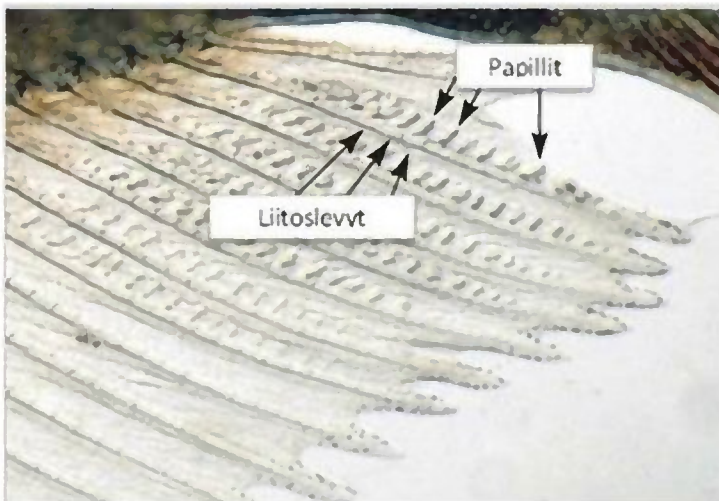
Tärkeimmät materiaalit ja reagenssit

- Dissektiomikroskooppi (jossa voi olla kamera liitettynä)
- Kiinnitysaine (esimerkiksi Davidsonin aine, Bouinin ainetta ei suositella), jos laskentaa ei tehdä kuvasta

Menettelyt

Ruumiinavauksen jälkeen peräevä on kuvattava, jotta peräeväpapillit voidaan laskea helposti. Kuvantaminen on suositeltu menetelmä, mutta peräevä voidaan myös kiinnittää Davidsonin kiinnitysaineella tai muulla sopivalla kiinnitysaineella (noin minuutin ajan). Kiinnityksen ajan peräevä on tärkeä pitää litteänä, jotta papillien laskeminen on helpompaa. Ruumis ja peräevä voidaan säilöä Davidsonin kiinnitysaineeseen tai muuhun sopivaan aineeseen siihen asti, kun ne analysoidaan. Laske niiden liitoslevyjen lukumäärä (ks. **kuva 1**), joissa on levyn takareunasta esiin työntyviä papilleja.

Kuva 1: Peräeväpapillit



Lisäys 9

MEORGT-TESTIN TARKKA AIKAJANA

Testiviikot 1–3 (F0)

F0-sukupolven kutevat kalat, jotka täyttävät valintaperusteet (ks. 16–20 kohta), altistetaan kolmen viikon ajaksi, jotta kehittyvät gameetit ja sukurauhaskudokset altistuvat testikemikaalille. Jokaisessa rinnakkaisnäytesäiliössä on yksi lisääntyvä kalapari (XX-naaraasta ja XY-koiraasta muodostuva pari). Mätimunat kerätään ja lasketaan, ja niistä arvioidaan hedelmällisyys 21 peräkkäisen päivän ajan testipäivästä 1 aloittaen.

Testiviikko 4 (F0 ja F1)

Hedelmöittyneet ja elinkykyiset munat (alkiot) kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkioita yhteen inkubaattoriin). Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (hedelmöittyneiden munien kuoleman voi havaita erityisesti varhaisvaiheissa: läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkyttömyys, OECD 210).

Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontroleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkioita, kyseisen käsittelyn alkioiden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkaan tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkioita, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkioita. Lisäksi F0-sukupolven voidaan lisätä lisääntyviä pareja jokaiseen käsittelyyn ja kontrolliin, jotta munien tuotanto lisääntyisi siten, että suositus 20 munasta rinnakkaisnäytettä kohti täyttyisi.

Testipäivänä 24 F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin. Tarvittaessa F0-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F1-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudelleen.

Testiviikot 5–6 (F1)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Koska alkioita kuoriutuu joka päivä, kuoriutuneet kalanpoikaset yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti kuhunkin poikasten rinnakkaisnäytesäiliöön tietyn käsittelyn mukaisesti. Yhdessä säiliössä saa olla enintään 12 kuoriutunutta kalanpoikasta. Tämä tehdään

valitsemalla kalanpoikaset satunnaisesti ja laittamalla yksi kalanpoikanen peräkkäisiin rinnakkaisnäytteisiin sattumanvaraisesti siirtymällä järjestyksessä tietyn käsittelyn rinnakkaisnäytteestä toiseen, kunnes kaikissa käsittelyn näytteissä on 12 kalanpoikasta. Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi, jotta niitä riittäisi kaikkiin rinnakkaisnäytteisiin, on varmistettava, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 kalanpoikasta, jotta F1-vaihe voidaan aloittaa.

Munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika, katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään. Kalanpoikasten lukumäärä kirjataan, ja kuoriutuvuus lasketaan jokaisesta rinnakkaisnäytteestä.

Testiviikot 7–11 (F1)

Ruskuaispussipoikasten eloonjääminen tarkastetaan ja kirjataan päivittäin kaikista rinnakkaisnäytteistä. Testipäivänä 43 elossa olevien kalojen lukumäärä jokaisesta rinnakkaisnäytteestä kirjataan, kuten myös rinnakkaisnäytteeseen alun perin laitettujen kuoriutuneiden kalanpoikasten määrä (nimellislukumäärä 12). Tämän avulla voidaan laskea eloonjäämisen prosentuaalinen osuus kuoriutumisesta poikasvaiheeseen.

Testiviikot (F1)

Testipäivänä 78–82 jokaisen kalan pyrstöevästä otetaan pieni näyte yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämiseksi (ts. eväleike) kaikkien kalojen osalta. Tämän tiedon perusteella muodostetaan lisääntyvät parit.

Kolmen päivän kuluessa siitä, kun jokaisen kalan genotyyppinen sukupuoli on määritetty, muodostetaan 12 lisääntyvää paria jokaiseen käsittelyyn ja 24 paria jokaiseen kontrolliin sattumanvaraisesti. Jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan satunnaisesti kaksi XX- ja XY-kalaa, jotka yhdistetään sukupuolittain, ja sen jälkeen niistä valitaan satunnaisesti kaksi kalaa lisääntyvän parin (eli XX–XY-parin) muodostamiseksi. Kuhunkin kemikaalikäsittelyyn tehdään vähintään 12 rinnakkaisnäytettä ja kuhunkin kontrolliin vähintään 24 näytettä, ja jokaiseen näytteeseen laitetaan yksi lisääntyvä pari. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa yhdistämistä varten, tarvittavan sukupuoligenotyypin mukainen kala on otettava muista käsittelyn rinnakkaisnäytteistä.

Loput kalat (enintään 8 kussakin rinnakkaisnäytteessä) lopetetaan humanisti, ja niistä otetaan poikasvaiheen eri päätetapahtumien mukaiset näytteet. Kaikista poikasvaihenäytteistä säilytetään *dmy*-tiedot (XX vai XY), jotta voidaan varmistaa, että kaikki päätetapahtumatiedot voidaan liittää jokaisen yksittäisen kalan geneettiseen sukupuoleen.

Testiviikot 13–14 (F1)

Altistusta jatketaan, kun poikasvaiheen lisääntyvät parit kehittyvät aikuisiksi. Testipäivänä

98 (eli munien keräämistä edeltävänä päivänä) munat otetaan pois sekä akvaarioista että naaraista.

Testiviikot 15–17 (F1)

Kutemisen aikana lasketut mätimunat kerätään päivittäin 21 peräkkäisen päivän ajan kaikista rinnakkaisnäytteistä, ja niiden fekunditeetti ja hedelmällisyys arvioidaan.

Testiviikko 18 (testiviikon 4 toisto) (F1 ja F2)

Testipäivän 120 aamuna munat kerätään jokaisesta rinnakkaisnäytesäiliöstä. Kerätyt munat arvioidaan, ja jokaisen lisääntyvän parin hedelmöittyneet munat (joista on poistettu rihmat) yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti munien inkubointikammioihin (20 munaa yhteen inkubaattoriin). Inkubaattorit voidaan laittaa erillisiin ”inkubaattorisäiliöihin”, jotka on valmisteltu kutakin käsittelyä varten, tai rinnakkaisnäytesäiliöön, jotka sisältävät kuoriutumisen yhteydessä kuoriutuneet ruskuaispussipoikaset. Alkiot kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkioita yhteen inkubaattoriin). Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontroleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkioita, kyseisen käsittelyn alkioden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkaan tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkioita, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkioita.

Testipäivänä 121 (tai testipäivänä 122, jotta varmistetaan, että F2-sukupolven luominen on alkanut hyvin) F1-sukupolven lisääntyvät parit lopetetaan humanisti ja niistä analysoidaan aikuisten kalojen päätetapahtumat. Tarvittaessa F1-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F2-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudestaan.

Testiviikot 19–20 (F2)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Jos testi päättyy F2-sukupolven kuoriutumiseen, kuoriutuneet kalanpoikaset lasketaan joka päivä ja hävitetään sen jälkeen. (Alkiot, jotka eivät ole kuoriutuneet pidennetyn inkubointiajan (kaksi kertaa kontrollin kuoriutumispäivän mediaani) jälkeen, katsotaan elinkyvyttömiksi.)

Lisäys 10

TILASTOANALYYSI

MEORGT-testistä saadut biologisten tietojen tyypit eivät ole vain sille ominaisia. Patologisia tietoja lukuun ottamatta on kehitetty monia sopivia tilastomenetelmiä, joilla voidaan analysoida samanlaisia tietoja asianmukaisesti sen mukaan, millaisia piirteitä tiedoissa on (esimerkiksi normaalisuus, varianssin yhtenäisyys, se, sopiiko tutkimus rakenteeltaan hypoteesin testaamiseen tai regressioanalyysiin, parametriset vs. ei-parametriset testit jne.). Yleisperiaate on se, että ehdotetuissa tilastoanalyysseissa noudatetaan ekotoksisuustietoja koskevia OECD:n suosituksia (OECD 2006) ja MEORGT-testin aineistoanalyysia koskevaa päätöksenteon vuokaaviota (kuva 2).

Oletuksena on, että useimmiten tietueet kuvastavat monotonisia vasteita. Lisäksi on otettava huomioon kysymys yksisuuntaisen tilastollisen testin käyttämisestä verrattuna kaksisuuntaiseen tilastolliseen testiin. Ellei ole biologisia perusteita, joiden nojalla yksisuuntainen testi on epätarkoituksenmukainen, suositellaan käytettävän yksisuuntaisia testejä. Jäljempänä suositellaan tiettyjä tilastollisia testejä, mutta jos kehitetään tarkoituksenmukaisempia ja/tai selitysvoimaltaan parempia tilastomenetelmiä sovellettavaksi tiettyihin MEORGT-testissä saatuihin tietoihin, näitä tilastollisia testejä on syytä käyttää, jotta niistä koituvia etuja voidaan hyödyntää.

MEORGT-testistä saadut tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen. On kaksi strategiaa analysoida niiden kalojen tiedot, joiden sukupuoli on vaihtunut (joko XX-koiraat tai XY-naaraat): 1) sensuroidaan koko testistä kaikki tiedot kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, lukuun ottamatta sukupuolen vaihtumisen esiintyvyyttä kussakin rinnakkaisnäytteessä; 2) säilytetään aineistossa tiedot kaikista kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, ja analysoidaan ne genotyyppin perusteella.

Histopatologiset tiedot

Histopatologiset tiedot raportoidaan vakavuuspisteinä, jotka arvioidaan hiljattain kehitetyllä tilastomenetelmällä nimeltä Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green ja muut, 2014). *Rao-Scottin* mukautus säilyttää testin toistamista koskevat tiedot; *by Slices* -menettely sisältää biologisen odotuksen, jonka mukaan vakavuuspisteillä on taipumus lisääntyä käsittelypitoisuuksien suurentuessa. RSCABS-menetelmällä saatu tulos määrittää jokaisen diagnoosin osalta, missä käsittelyissä patologisia löydöksiä esiintyy enemmän kuin kontroleissa, ja näihin liittyvän vakavuusasteen.

Fekunditeettitiedot

Fekunditeettitietojen analyysi koostuu askeltavasta Jonckheere-Terpstran tai Williamsin testistä, jolla määritetään käsittelyn vaikutukset, jos tiedot ovat yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa. Askeltavassa testissä kaikki vertailut tehdään 0,05:n merkitsevyystasolla, eikä siinä tehdä mukautusta vertailujen lukumäärään nähden. Tietojen oletetaan olevan yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, mutta tämä voidaan

varmentaa joko tarkastamalla tiedot silmämääräisesti tai tekemällä lineaariset ja kvadraattiset kontrastit käsittelyjen keskiarvoista tietojen arvojärjestysmuunnoksen jälkeen. Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti ei ole, tehdään trenditesti. Muussa tapauksessa käsittelyn vaikutusten määrittämiseen käytetään Dunnetin testiä, jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssit ovat homogeenisia. Jos nämä vaatimukset eivät täyty, tehdään Dunnin testi Bonferonni-Holmin mukautuksella. Kaikki mainitut testit tehdään riippumatta mahdollisesta yleisestä F- tai Kruskal-Wallis testistä. Tarkempia tietoja on julkaisussa OECD 2006.

Muitakin menetelmiä (munien määrän osalta vaikkapa yleistettyä lineaarista mallia Poissonin virheineen ilman muunnosta) voidaan käyttää, jos se on tilastollisesti perusteltua (Cameron ja Trividi, 2013). Tilastotieteellinen neuvonta on suositeltavaa, jos muita menetelmiä käytetään.

Päivittäinen munamäärä yhdessä sukupolvessa

ANOVA-mallissa käytetään kaavaa $Y = \text{Time} * \text{Time} + \text{Treatment} + * \text{Treatment} + \text{Time} * \text{Treatment} + * \text{Time} * \text{Treatment}$, satunnaisvaikutusten osalta $\text{Replicate}(\text{Generation} * \text{Treatment})$ ja $\text{Time} * \text{Replicate}(\text{Treatment})$. Näin saadaan kummankin tyyppin erisuuren varianssin komponentit sukupolvista. Kaavassa ajalla (time) tarkoitetaan munienkeruun tiheyttä (päivä tai viikko). Tämä on toistettujen toimenpiteiden analyysi, jossa on myös korrelaatioita samoja rinnakkaisnäytteitä koskevien havaintojen välillä, koska tiedot siis liittyvät toistettuihin toimenpiteisiin.

Käsittelyn tärkeimmät vaikutukset testataan Dunnetin (tai Dunnett-Hsun) testillä, jossa käytetään vertailujen lukumäärän mukautusta. Mukautukset ovat tarpeen tarkasteltaessa sukupolvea tai aikaa tärkeimpänä vaikutuksena, koska näille kahdelle tekijälle ei ole kontrollitasoa ja jokaisella tasoparilla voi olla vertailun kannalta mahdollista merkitystä. Jos näiden kahden tärkeimmän vaikutuksen yhteydessä tärkeimmän vaikutuksen F-testi on merkitsevä 0,05:n tasolla, parittaiset vertailut tämän tekijän tasoilla voidaan testata 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta.

Malli sisältää kahden ja kolmen tekijän yhteisvaikutuksia, jolloin esimerkiksi aika tärkeimpänä vaikutuksena ei välttämättä ole merkitsevä, vaikka aika vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. Jos siis kahden tai kolmen tekijän yhteisvaikutus, johon sisältyy aika, on merkitsevä 0,05:n tasolla, ajan tasojen vertailut 0,05:n merkitsevyystasolla voidaan hyväksyä ilman muuta mukautusta.

Seuraavaksi tehdään F-testit käsittelyn merkitsevyydestä ajassa (eli ns. osat ANOVA- taulukossa). Jos esimerkiksi käsittelyä koskeva osa F1-sukupolven ja ajan 12 suhteen on merkitsevä 0,05:n tasolla, käsittelyn parittaiset vertailut F1-sukupolven ja ajan 12 osalta voidaan hyväksyä 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta. Samanlaisia lausekkeita sovelletaan testeihin, jotka koskevat aikaa F1:n ja sukupolven sisällä ja sukupolvea ajan ja käsittelyn sisällä.

Ne vertailut, jotka eivät kuulu mihinkään edellisiin luokkiin, on mukautettava käyttämällä

Bonferroni-Holmin mukautusta p-arvoihin. Lisätietoja tällaisten mallien analyyseista on julkaisuissa Hocking (1985) sekä Hochberg ja Tamhane (1987).

Vaihtoehtoisesti voidaan tallentaa raakatiedot ja esittää ne tutkimusraportissa fekunditeettina (munien lukumäärä) rinnakkaisnäytettä kohti joka päivältä. Rinnakkaisnäytteiden raakatietojen keskiarvo on laskettava ja sen jälkeen siihen on sovellettava neliöjuurimuunnosta. Muunnettujen rinnakkaisnäytekyskiarvojen yksisuuntainen ANOVA on laskettava Dunnettin kontrastien avulla. Kunkin käsittelyn ja/tai rinnakkaisnäytteen fekunditeettitiedot kannattaa myös tarkastaa silmämääräisesti pistekaaviolla, joka näyttää tiedot ajan suhteen. Näin mahdollisia aikaan liittyviä vaikutuksia voidaan arvioida epävirallisesti.

Kaikki muut biologiset tiedot

Tilastolliset analyysit perustuvat oletukseen, että jos annos on valittu asianmukaisesti, aineisto on monotoninen. Aineiston oletetaan siis olevan monotoninen, ja sen monotonisuus arvioidaan virallisesti käyttämällä lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos aineisto on monotoninen, suositellaan Jonckheere-Terpstran trenditestiä rinnakkaisnäytteiden mediaaneille (julkaisussa OECD 2006 suositellun mukaisesti). Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti taas ei ole, aineiston katsotaan olevan ei-monotoninen.

Jos aineisto on ei-monotoninen etenkin siksi, että suurimman pitoisuuden tai kahden suurimman pitoisuuden osalta vaste on ollut pienempi, on syytä harkita näiden tietojen sensurointia, jolloin analyysi siis tehdään ilman näitä käsittelyitä. Päätös on tehtävä asiantuntijan harkinnan perusteella, ja siinä on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, etenkin ne, joissa toksisuus on ollut selvää näillä pitoisuuksilla.

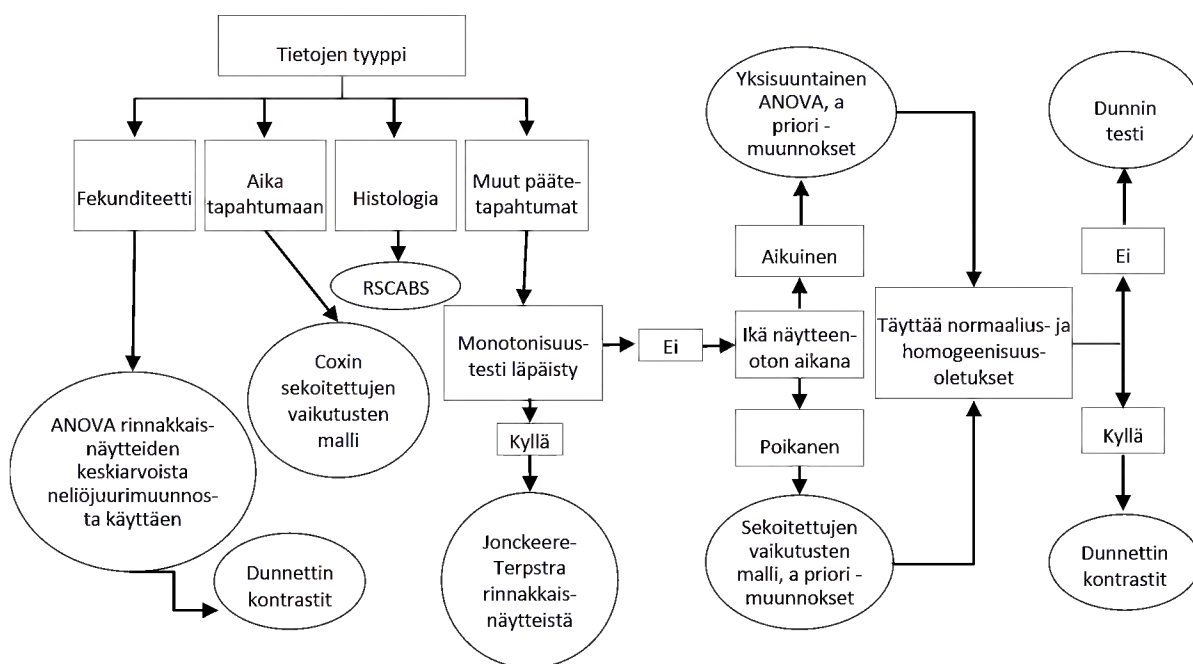
Paino- ja pituustietojen osalta muuntamista ei suositella, vaikka se voi toisinaan olla tarpeen. Vitellogeniinitiedoille suositellaan kuitenkin logaritimuunnosta; sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia (peräeväpapillit) koskeville tiedoille suositellaan neliöjuurimuunnosta, ja arkussini-neliöjuurimuunnosta suositellaan kuoriutumisasasteen, prosentuaalisen eloonjääneisyyden, sukupuolten suhteen ja hedelmöittyneiden munien prosenttiosuuden tiedoille. Kuoriutumisaikaa ja ensimmäisen kudun ajankohtaa on käsiteltävä tapahtumisaikatietoina, ja yksittäisiä alkioita, jotka eivät kuoriutuneet määritettynä aikana, tai rinnakkaisnäytteiden kaloja, jotka eivät kuteneet koskaan, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina. Kuoriutumisaika on laskettava kunkin rinnakkaisnäytteen kuoriutumispäivän mediaanista. Nämä päätetapahtumat on analysoitava käyttämällä sekoitettuja vaikutuksia koskevaa Coxin suhteellisen vaaran mallia.

Aikuisnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään yksi mittaus rinnakkaisnäytettä kohti eli yhdestä XX-kalasta ja yhdestä XY-kalasta rinnakkaisakvaariossa. Tämän vuoksi suositellaan, että rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista tehdään yksisuuntainen ANOVA-testi. Jos ANOVAn oletukset (normaalisuus ja varianssin homogeenisuus arvioituina ANOVAn jäännöksillä Shapiro-Wilksin testillä ja Levenen testillä) toteutuvat, ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista, on määritettävä Dunnettin kontrasteilla. Jos taas ANOVAn

oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista. Samanlaista menettelyä suositellaan prosenttiosuutena ilmoitettaville tiedoille (hedelmällisyys, kuoriutuminen ja eloonjääneisyys).

Poikasnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään 1–8 mittausta rinnakkaisnäytettä kohti. Niiden yksilöiden määrä voi siis vaihdella, jotka vaikuttavat rinnakkaisnäytteiden keskiarvoon kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta. Sen vuoksi on suositeltavaa käyttää sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallia ja sen jälkeen Dunnin kontrasteja, jos normaalisuutta ja varianssin homogeenisuutta koskevat oletukset toteutuivat (sekoitettujen vaikutusten ANOVA-testin jäännöksillä). Jos oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista.

Kuva 2: Vuokaavio MEORGT-testin aineiston analyysille suositelluista tilastomenettelyistä



Lähdekirjallisuus

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 SAMMAKKOELÄINTEN TOUKKIEN KASVUA JA KEHITYSTÄ MITTAAVA TESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 241 (2015). Tarve kehittää ja validoida tutkimus, jolla pystytään havaitsemaan ja luonnehtimaan myrkyllisille kemikaaleille altistumisesta johtuvia haittavaikutuksia sammakkoeläimille, perustuu huolenaiheisiin, joiden mukaan kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille. Tässä sammakkoeläinten toukkien kasvua ja kehitystä mittaavaa testiä (Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)) koskevassa OECD:n testiohjeessa kuvataan sammakkoeläimillä tehtävä toksisuustesti, jossa tarkastellaan kasvua ja kehitystä hedelmöittymisestä varhaisen juveniilivaiheen ajan. Tässä testissä, joka kestää yleensä 16 viikkoa, arvioidaan varhaisvaiheen kehitystä, muodonvaihdoista, eloonjäämistä, kasvua ja osittain myös lisääntymiskypsyyttä. Testin avulla voidaan mitata myös joukko muita päätetapahtumia, joiden perusteella voidaan tehdä diagnostinen arviointi oletetuista hormonaalisista haitta-aineista tai muista kehitykseen ja lisääntymiseen vaikuttavista myrkyllisistä aineista. Tässä testimenetelmässä selostettu menetelmä perustuu afrikankynsisammakolla (*Xenopus laevis*) tehtyyn validointitutkimukseen, jonka on toteuttanut Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluvirasto EPA. Täydentäviä tutkimuksia on tehty Japanissa (1). Vaikka kasvua ja kehitystä arvioivaan testiprotokollaan voivat soveltua myös muut sammakkoeläinlajit, varsinkin sellaiset, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää, koska se on tärkeä osa testiä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään *Xenopus laevis*ta.
2. LAGDA on korkeamman tason testi, jossa sammakkoeläimistä voidaan kerätä haittavaikutuksista tavallista kattavampia pitoisuus-vastetietoja, joita voidaan käyttää vaarojen tunnistamisessa ja luonnehtimisessa sekä ympäristöriskien arvioinnissa. Testiä voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 4, jolla *in vivo* -testeistä saadaan myös tietoa haittavaikutuksista hormonijärjestelmän kannalta oleellisten päätetapahtumien osalta (2). Pääpiirteissään testi koostuu Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaiheessa 8–10 olevien *X. laevis* -alkioiden altistamisesta vähintään neljälle pitoisuudelle testikemikaalia (porrastus yleensä enintään puolilogaritmisin välein) ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollieläinten NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos (≤ 45 päivää hedelmöittymisen jälkeen; yleensä noin 45 päivää (päivää hedelmöittymisen jälkeen, phj). Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätetapahtumat (väliaikaisesta osaotoksesta ja lopullisesta otoksesta testin päättyessä) ovat sellaisia, jotka

viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin. Menetelmässä painotetaan ensisijaisesti mahdollisia populaation kannalta oleellisia vaikutuksia (eli eloonjääneisyyteen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiskehitykseen kohdistuvia haittavaikutuksia), kun lasketaan pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC-arvo), tai vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x % muutoksia (ECx) mitattavassa päätetapahtumassa. On kuitenkin muistettava, etteivät ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat useinkaan sovellu tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien lukumäärän kasvattaminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi saattaa olla epäkäytännöllistä. Lisäksi on muistettava, ettei menetelmä kata varsinaista lisääntymisvaihetta. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, validointiin osallistui vain muutama laboratorio, eikä etenkin laboratorioiden välistä toistettavuutta ole vahvistettu kokeellisin tiedoin. Sen vuoksi on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, OECD:n testiohjetta 241 tarkistetaan ja muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. LAGDA on tärkeä tutkimus, jolla voidaan tarkastella sammakkoeläinpopulaation heikkenemiseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä. Siinä arvioidaan kemikaalialtistuksen vaikutuksia herkan toukkavaiheen aikana, kun eloonjäämiseen ja kehitykseen, myös lisääntymiselinten normaaliin kehitykseen, kohdistuvat vaikutukset voivat vaikuttaa populaatioihin haitallisesti.
4. Testi on suunniteltu havaitsemaan sekä endokriinisista että muista kuin endokriinisista mekanismeista johtuva apikaalinen vaikutus (johtuvat vaikutukset), ja siihen sisältyy diagnostisia päätetapahtumia, jotka ovat osittain spesifejä keskeisille endokriinisille vaikutustavoille. Ennen kuin LAGDA-testi kehitettiin, ei ollut sellaista validoitua testiä, joka olisi täyttänyt tämän tehtävän sammakkoeläinten osalta.
5. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen. Testi kestää noin 16 viikkoa, ja sinä aikana tarvitaan yhteensä 480 koe-eläintä eli *X. laevis* alkiota (tai 640 alkiota, jos käytetään liuotinkontrollia), jotta voidaan varmistaa, että testin todistusvoima on riittävä

populaation kannalta oleellisten päätetapahtumien, kuten kasvun, kehityksen ja lisääntymiskypsyysyden, arvioinnissa.

6. Ennen kuin testimenetelmää käytetään sääntelyn edellyttämään seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset sääntelyn tavoitteen kannalta. Tässä testissä ei myöskään arvioida fekunditeettia suoraan, joten se ei välttämättä ole sovellettavissa OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasoa 4 ylemmällä tasolla.

TESTIMENETELMÄN TIETEELLINEN PERUSTA

7. Siitä, mitä nykyään tiedämme sammakkoeläinten biologiasta, suuri osa on hankittu käyttämällä koe-eläinlajina *X. laevis*. Tätä lajia voidaan kasvattaa laboratoriossa helposti, ja sen ovulaatio voidaan saada aikaan käyttämällä ihmisen koriongonadotropiinia (hCG). Lisäksi eläinkantoja saadaan nopeasti kaupallisilta kasvattajilta.
8. Kaikkien selkärankaisten tavoin sammakkoeläinten lisääntymistä säätelee hypothalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli) (4). Tämä endokriinisen järjestelmän välittäjiä ovat estrogeenit ja androgeenit, jotka ohjaavat sukupuolisesti dimorfisten kudosten kehittymistä ja fysiologiaa. Sammakkoeläinten elinkaareissa on kolme erillistä vaihetta, joissa tämä akseli on erityisen aktiivinen: 1) sukurauhasten erilaistuminen toukkavaiheen aikana, 2) sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehittyminen ja sukurauhasten kypsyminen juveniilivaiheessa ja 3) aikuisten sammakkoeläinten toiminnallinen lisääntyminen. Kukin näistä kolmesta kehitysikkunasta on todennäköisesti altis tiettyjen kemikaalien, kuten estrogeenien ja androgeenien, aiheuttamalle hormonijärjestelmän häiriöille, mikä lopulta johtaa organismien lisääntymiskyvyn häviämiseen.
9. Sukurauhaset alkavat kehittyä NF-vaiheessa 43, kun bipotentiaalinen sukupuoliharjanne muodostuu. Sukurauhasten erilaistuminen alkaa NF-vaiheessa 52, kun varhaisvaiheen itusolut joko kulkeutuvat kehittyvien sukurauhasten medullaariseen kudokseen (koiraat) tai jäävät kortikaaliselle alueelle (naaraat) (3). *Xenopus*-lajilla tämän sukurauhasten sukupuolisen erilaistumisen prosessin raportoitiin jo 1950-luvulla olevan altis kemikaalien aiheuttamalle muutokselle (5) (6). Sammakonpoikasten altistaminen estradiolille tämän sukurauhasten erilaistumisen vaiheen aikana aiheutti sukupuolen vaihtumisen koiraille, jotka olivat täysikasvuisina täysin toimintakykyisiä naaraita (7) (8). Toiminnallinen sukupuolen vaihtuminen naaraasta koiraksi on myös mahdollista, ja sitä on raportoitu tutkimuksista, joissa sammakonpoikasiin on istutettu kiveskudosta (9). Vaikka myös aromataasin estäjälle altistuminen aiheuttaa toiminnallisen sukupuolen vaihtumisen *X. tropicalis* -lajilla (10), tämän ei ole osoitettu tapahtuvan *X. laevis* -lajilla. Aikaisemmin myrkyllisten aineiden vaikutusta sukurauhasten erilaistumiseen on arvioitu sukurauhasten histologisilla tutkimuksilla muodonvaihdosvaiheessa, ja sukupuolen vaihtuminen on voitu

määrittää vain sukupuolten suhteita määrittämällä. Viime aikoihin saakka ei ole ollut keinoja määrittää *Xenopus*-lajin sammakoiden geneettistä sukupuolta suoraan. Hiljattain *X. laevis*-lajista on kuitenkin löydetty sukupuoleen liittyviä markkereita, joiden avulla geneettisen sukupuolen määrittäminen ja niiden eläinten tunnistaminen, joiden sukupuoli on vaihtunut, ovat tulleet mahdollisiksi (11).

10. Koirailta juveniilivaiheen kehittyminen etenee, kun testosteronin pitoisuus veressä kasvaa sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien ja kivesten kehittymistä vastaavasti. Naarailla munasarjat alkavat tuottaa estradiolia, jolloin plasmassa on havaittavissa vitellogeniiniä (VTG), munasarjoissa vitellogeenioosyyttejä, ja munanjohtimet alkavat kehittyä (12). Munanjohtimet ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, joilla on tehtävä oosyyttien kypsyämisessä lisääntymisen aikana. Oosyyttien pintaan muodostuu hyytelömäinen kuori, kun ne kulkevat munanjohtimen läpi ja kerääntyvät munapussiin valmiina hedelmöitymistä varten. Estrogeenit vaikuttavat säätelevän munanjohtimien kehittymistä, koska *X. laevis*-lajilla (13) ja *X. tropicalis*-lajilla (12) se korreloi veren estradiolipitoisuuden kanssa. Koirailta on raportoitu munanjohtimien kehittymistä polyklooratuille bifenyylilyhdisteille (14) ja 4-*tert*-oktyylifenolille (15) altistumisen jälkeen.

TESTIN PERIAATE

11. Testissä NF-vaiheessa 8–10 olevat *X. laevis* -alkiot altistetaan vesireittiä neljälle pitoisuudelle testikemikaalia ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollin NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos. Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä on tähän mennessä niukalti kokemusta. Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kustakin käytettävästä kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätapahtumat ovat sellaisia, jotka viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (ts. kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin (ts. kilpirauhasen histopatologia, sukurauhasten ja sukujohtimien histopatologia, epänormaali kehittyminen, plasman vitellogeniinipitoisuus (valinnainen) ja genotyyppisen/fenotyyppisen sukupuolen suhteet).

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

12. Testin validiteettiä sovelletaan seuraavia kriteerejä:

- Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 40 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.
 - Veden lämpötilan on oltava alueella 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään $1,0$ °C.
 - Testiliuoksen pH-arvon on pysyttävä välillä 6,5–8,5, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5.
 - Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.
 - Altistusaikana kuolleisuuden tulee olla ≤ 20 prosenttia jokaisessa kontrollirinnakkaisnäytteessä.
 - Elinkyvyn on oltava ≥ 70 prosenttia tutkimuksen aloittamiseen valitussa kudussa.
 - Kontrolleissa NF-vaiheen 62 alkamisajan mediaanin on oltava ≤ 45 päivää.
 - Testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) $1,0 \pm 0,2$ g ja testin lopettamisvaiheessa $11,5 \pm 3$ g.
13. Lisäksi suositellaan, että analyysiin on käytettävissä vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumaton rinnakkaisnäytettä, vaikka tämä ei olekaan validiteettiperuste. Liiallinen kuolleisuus, joka vaarantaa tietyn käsittelyn, määritellään näin: > 4 kuollutta eläintä (> 20 %) kahdessa tai useammassa rinnakkaisnäytteessä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Analyysia varten saatavilla on oltava vähintään kolme käsittelypitoisuutta, joissa ei ole merkkejä selvästä toksisuudesta. Selvän toksisuuden merkkejä ovat esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen, ärsykeisiin reagoimattomuus, morfologiset poikkeavuudet (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), verta vuotavat leesiot ja vatsan turvotus.
14. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMIEN KUVAUS

Laitteisto

15. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

- a) lämpötilan valvontalaitteet (ts. lämmittimet tai jäähdyttimet, säädettävä lämpötila 21 ± 1 °C)
- b) lämpömittari

- c) kaksioksulaarinen dissektiomikroskooppi ja dissektiovälineet
- d) digitaalikamera, jonka tarkkuus on vähintään neljä megapikseliä ja jossa on mikrotoiminto (tarvittaessa)
- e) analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,001 mg tai 1 µg
- f) liuenneen hapen mittari ja pH-mittari
- g) valotehon mittari, jossa mittayksikkönä luksit.

Vesi

Lähde ja laatu

16. Mitä tahansa paikallisesti saatavilla olevaa laimennusvettä (esim. lähdevettä tai aktiivihiilisuodatettua hanavettä), jossa *X. laevis* voi kasvaa ja kehittyä normaalisti, voidaan käyttää. Todisteet normaalista kasvusta tässä vedessä on esitettävä. Koska paikallisen veden laatu voi vaihdella huomattavasti alueelta toiselle, veden laatu on analysoitava etenkin silloin, jos saatavilla ei ole aiempia tietoja veden käyttökelpoisuudesta sammakkoeläinten toukkien kasvattamisessa. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava ennen testin aloittamista ja/tai esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiveden jodipitoisuus

17. Jotta kilpirauhanen voi syntetisoida tyroksiinihormonia normaalin muodonvaihdon tukemiseksi, toukkien on saatava vedestä ja ravinnosta riittävästi jodia. Tällä hetkellä empiirisesti johdettuja ohjeita asianmukaisen kehityksen varmistavista vähimmäisjodipitoisuuksista ravinnossa tai vedessä ei ole. Jodin saatavuus voi kuitenkin vaikuttaa siihen, miten kilpirauhasjärjestelmä reagoi kilpirauhaseen vaikuttaviin aineisiin, ja sen tiedetään muokkaavan kilpirauhasen perustoimintaa. Tämä seikka on syytä ottaa huomioon kilpirauhasen histopatologisia tuloksia tulkittaessa. Aiempien tutkimusten perusteella testin on osoitettu toimivan hyvin, kun laimennusveden jodin (I^-) pitoisuus vaihteli välillä 0,5–10 µg/l. Ihannetapauksessa laimennusveden vähimmäisjodipitoisuuden tulisi olla 0,5 µg/l koko testin ajan (lisättynä natrium- tai kaliumsuolana). Jos testivesi valmistetaan deionisoidusta vedestä, jodia on lisättävä sen verran, että vähimmäispitoisuudeksi tulee 0,5 µg/l. Testivedestä (ts. laimennusvedestä) mitatut jodipitoisuudet ja testiveden täydentäminen jodilla tai muilla suoloilla (jos käytetty) on raportoitava. Jodipitoisuus voidaan mitata myös ravinnosta testiveden lisäksi.

Altistusjärjestelmä

18. Testin kehittämisessä käytettiin läpivirtauslaimenninjärjestelmää. Järjestelmän veden kanssa kosketuksiin joutuvien osien tulee olla lasia, ruostumatonta terästä ja/tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Altistussäiliöiden on oltava lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja akvaarioita, ja säiliön käyttötilavuuden tulee olla 4,0–10,0 litraa (veden vähimmäissyvyys 10–15 cm). Järjestelmässä on voitava käyttää kaikkia altistuspitoisuuksia, kontrollia ja tarvittaessa liuotinkontrollia sekä neljää rinnakkaisnäytettä käsittelyä kohti ja kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja kohti. Jokaisen säiliön virtausnopeuden on oltava tasainen, kun otetaan huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpitäminen että kemikaalialtistus. Virtausnopeuden on oltava riittävä (säiliön tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 kertaa päivässä). Näin vältetään kemikaalipitoisuuden pieneneminen sekä testiorganismien että akvaarioissa olevien vesieliöiden metabolian tai abioottisten hajoamisreittien (hydrolyysi, fotolyysi) tai häviämisen (haihtuminen, sorptio) takia. Käsittelysäiliöt on laitettava altistusjärjestelmään sattumanvaraisesti paikkoihin, jotta mahdolliset sijainnista johtuvat vaikutukset sekä pienet lämpötilan, valotehon jne. vaihtelut voidaan minimoida. Lisätietoja läpivirtaukseen perustuvan altistusjärjestelmän rakentamisesta on ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians” (16).

Kemikaalin annostelu: testiliuosten valmistaminen

19. Altistusjärjestelmän testiliuokset valmistetaan annostelemalla testikemikaalin varastoliuosta altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla tai muulla laitteella. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Jokaisen kammion testiliuoksen on vaihduttava vähintään viisi kertaa päivässä.
20. Menetelmä, jolla testikemikaali annostellaan järjestelmään, voi vaihdella kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Ennen testiä on siksi hankittava kemikaalista perustiedot, joilla on merkitystä sen testattavuuden kannalta. Hyödyllisiä tietoja testikemikaalin ominaisuuksista ovat rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a ja K_{ow} , vesiliukoisuus (mieluiten testimediumissa) ja höyrynpaine sekä tulokset nopean biohajoavuuden testistä (testimenetelmä C.4 (17) tai C.29 (18)). Liukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää haihtumisen vuoksi testin aikana. Tämän testin tekemistä ilman edellä lueteltuja tietoja on syytä harkita tarkkaan, koska testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikuttavat tutkimuksen rakenteeseen ja ilman näitä tietoja testin tuloksia voi olla vaikea tulkita tai ne voivat olla merkityksettömiä. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja havaitsemisrajaltaan tunnettu luotettava analyysimenetelmä, jolla testikemikaali voidaan

määrittää kvantitatiivisesti testiliuoksissa. Vesiliukoiset testikemikaalit voidaan liuottaa laimennusveden alikvootteihin sellaisena pitoisuutena, jolla saadaan aikaiseksi testin tavoitepitoisuus läpivirtausjärjestelmässä. Huoneenlämmössä nestemäisten tai kiinteiden tai veteen kohtalaisesti liukenevien kemikaalien yhteydessä voidaan tarvita neste:neste- tai neste:kiinteä aine (esim. lasivillakolonne) -saturaattoreita (19). Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä tässä testissä on tähän mennessä niukalti kokemusta.

21. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (20) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Ensisijaisesti tulee käyttää liuotinvapaata testijärjestelmää. Koska eri testikemikaaleilla on erilaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kemikaalialtistusveden valmistamisessa on ehkä käytettävä erilaisia lähestymistapoja. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrittäisiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat, ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on merkittäviä vaikutuksia eläinten hyvinvointiin, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (21) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jollei aikaisempia tietoja ole, liuottimen sopivuus on määritettävä ennen lopullisen tutkimuksen tekemistä. Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (21), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. ≤ 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdolliset vaikutukset mitattaviin päätapahtumiin (22).

Koe-eläimet

Testilajit

22. Testilaji on *X. laevis*, koska sitä 1) kasvatetaan yleisesti laboratorioissa kautta maailman, 3) on saatavana helposti kaupallisilta toimittajilta ja 3) sen geneettinen sukupuoli voidaan määrittää.

Aikuisten eläinten hoito ja lisääntyminen

23. *X. laevis*ksen asianmukaista hoitoa ja lisääntymistä kuvataan vakio-ohjeissa (23). Myös Read (24) on kuvannut sen elinolosuhteita ja hoitoa. Lisäntymisprosessi käynnistetään injektoimalla 3–5 parille aikuisia naaraita ja koiraita ihmisen koriongonadotropiinia (hCG:tä) intraperitoneaalisesti. Naaraille injektoidaan 800–1000 IU ja koiraille 500–800 IU 0,6–0,9-prosenttiseen suolaliuokseen liuotettua hCG:tä (joka voidaan liuottaa myös sammakoiden Ringerin liuokseen eli sammakkoeläimille käytettävään isotoniseen suolaliuokseen: www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Injektiotilavuuden tulee olla noin 10 µl painogrammaa kohti (~1 000 µl). Parit, joiden on määrä lisääntyä, pidetään suurissa säiliöissä häiriöttä ja staattisissa olosuhteissa, jotta eläimet hakeutuvat paritteluasentoon helpommin. Jokaisessa lisääntymissäiliössä tulee olla ruostumattomasta teräsverkosta valmistettu valepohja (silmä koko 1,25 cm), jotta munat laskeutuvat säiliön pohjalle. Sammakot, joille hCG-injektio annetaan myöhään iltapäivällä, laskevat valtaosan munistaan yleensä seuraavan aamupäivän puolivälissä. Kun munia on laskettu riittävästi ja kun ne on hedelmöitetty, aikuiset eläimet on otettava pois lisääntymissäiliöistä. Sen jälkeen munat kerätään ja hyytelömäiset kuoret poistetaan L-kysteiinikäsittelyllä (23). Sitä varten on valmistettava 2-prosenttinen L-kysteiiniliuos, ja sen pH-arvoksi on säädettävä 8,1, mikä tehdään 1 M:lla NaOH:ta. Tämä liuos, jonka lämpötila on 21 °C, lisätään 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää yhden kudin munat. Pulloa sekoitetaan varovasti 1–2 minuuttia ja sen jälkeen se huuhdellaan perusteellisesti 6–8 kertaa 21-asteisella kasvatusvedellä. Tämän jälkeen munat siirretään kiteytysmaljaan ja tutkitaan, onko niistä > 70 prosenttia elinkykyisiä; alkioissa, joiden solujen todetaan jakautuvan, voi olla pieniä poikkeavuuksia.

TESTIN RAKENNE

Testipitoisuudet

24. On suositeltavaa käyttää vähintään neljää kemikaalipitoisuutta ja asianmukaisia kontrolleja (myös liuotinkontrolleja tarvittaessa). Pitoisuuksien porrastuskerroin voi olla 3,2; sitä suurempia kertoimia ei yleensä suositella.
25. Mikäli mahdollista, tässä testissä tulisi käyttää olemassa olevien sammakkoeläintutkimusten tuloksia suurimman testipitoisuuden määrittämisessä, jotta

selvästi toksiset pitoisuudet voidaan välttää. Tämän pitoisuuden määrittämisessä apua voi olla esimerkiksi kvantitatiivisiin rakenne-aktiivisuussuhteisiin ja vertailuun perustuvista tiedoista sekä muiden sammakkoeläintutkimusten tuloksista. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi sammakkoeläinten muodonvaihdoistutkimus, testimenetelmä C.38 (25) ja sammakon alkion teratogeneesitesti – *Xenopus* (23) ja/tai esimerkiksi testimenetelmien C.48, C.41 ja C.49 kaltaiset kalatestit (26) (27) (28). Ennen LAGDA-testin tekemistä voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystesti. Pitoisuusalueen määrittämistä koskeva altistus suositellaan aloitettavaksi 24 tunnin kuluessa hedelmöitymisestä, ja sitä pitää jatkaa 7–14 päivää (tarvittaessa kauemminkin). Testipitoisuudet pitää asettaa niin, että testipitoisuuksien välinen kerroin on enintään 10. Pitoisuusalueen määritystestin tarkoituksena on määrittää suurin LADGA-testissä käytettävä pitoisuus. Jos on käytettävä liuotinta, liuottimen sopivuus (eli se, voiko se vaikuttaa tutkimuksen tulokseen) voidaan selvittää osana pitoisuusalueen määritystestiä.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

26. Testissä on käytettävä vähintään neljää rinnakkaisnäytesäiliötä testipitoisuutta kohti ja vähintään kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja (ja tarvittaessa liuotinkontrollia) kohti (ts. kontrollien ja mahdollisen liuotinkontrollin rinnakkaisnäytteiden määrä tulee olla kaksi kertaa niin suuri kuin kunkin käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteiden lukumäärän. Näin varmistetaan riittävä tilastollinen voima). Kussakin rinnakkaisnäytteessä saa olla enintään 20 eläintä. Käsiteltävien eläinten vähimmäismäärä on 15 (5 eläintä NF-vaiheen 62 osaotokseen ja 10 juveniilia). Jokaisen rinnakkaisnäytteen mahdolliset kuolleet eläimet kuitenkin korvataan lisäämällä näytteeseen eläimiä, jotta säilytetään kriittinen määrä eli 15.

MENETTELY

Testin yleiskuvaus

27. Testi aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan siihen saakka, kunnes alkioit ovat kehittyneet juveniileiksi. Eläimet tutkitaan päivittäin kuolleisuuden ja mahdollisten epänormaalin käyttäytymisen merkkien varalta. NF-vaiheessa 62 otetaan osaotos toukista (enintään 5 eläintä / rinnakkaisnäyte), ja niistä tutkitaan eri päätetapahtumia (taulukko 1). Kun kaikki eläimet ovat kehittyneet NF-vaiheeseen 66 eli kun muodonvaihdos on tapahtunut (tai 70 päivän kuluttua testin aloittamisesta sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin), tehdään satunnainen karsinta (ilman osaotosta) eläinten määrän vähentämiseksi (10 eläintä / säiliö) (ks. 43 kohta). Muiden eläinten altistusta jatketaan siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaanista kontrollissa. Testin päättyessä (näytteenotto juveniileista) tehdään lisää mittauksia (taulukko 1).

Altistusolosuhteet

28. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista on lisäyksessä 3. Altistusjakson aikana liuennut happi, lämpötila ja testiliuosten pH-arvo on mitattava päivittäin. Johtavuus, emäksisyys ja kovuus mitataan kerran kuukaudessa. Testiliuosten lämpötilan osalta rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen väliset erot (yhtenä päivänä) saavat olla enintään 1,0 °C, ja testiliuosten pH-arvon ero rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välillä saa olla enintään 0,5.
29. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet voidaan poistaa säiliöistä lapolla päivittäin. Siinä on kuitenkin oltava huolellinen säiliöiden ristikontaminaation välttämiseksi. Myös stressin ja traumojen aiheuttaminen eläimille on pidettävä minimissään varsinkin niiden liikuttelun, akvaarioiden puhdistamisen ja käsittelyn aikana. Stressiä aiheuttavia olosuhteita/toimia (esimerkiksi kova ja/tai jatkuva melu, akvaarioihin koputtelu, säiliöön kohdistuva tärinä) on vältettävä.

Altistumisaika testikemikaalille

30. Altistuminen aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta (≤ 45 päivää testin aloittamisesta) kontrolliryhmässä. Yleensä LAGDA-testi kestää 16 viikkoa (ja enintään 17 viikkoa).

Testin aloittaminen

31. Testin aloittamisessa käytettyjen, poikasia saaneiden eläimien on täytynyt osoittaa aikaisemmin, että ne tuottavat jälkeläisiä, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää (lisäys 5). Aikuisten sammakoiden kutemisen jälkeen kerätään alkiot, joista poistetaan hyytelömäinen kuori kysteiinikäsittelyllä, ja ne seulotaan elinkyvyn perusteella (23). Kysteiinikäsittelyn ansiosta alkioita voidaan käsitellä seulonnan aikana ilman, että ne tarttuvat pintoihin. Seulonta tehdään dissektiomikroskoopilla, ja elinkyvyttömät alkiot poistetaan käyttämällä sopivankokoista tiputuspipettiä. Testissä suositellaan käytettävän yhdestä kutukerrasta peräisin olevia alkioita, joiden elinkyky on yli 70 prosenttia. NF-vaiheessa 8–10 olevat alkiot jaetaan satunnaisesti altistuskäsittelysäiliöihin, joissa on riittävästi laimennusvettä, kunnes jokaisessa säiliössä on 20 alkioita. Alkioita on käsiteltävä tämän siirron aikana varovasti, jotta käsittelystä aiheutuu mahdollisimman vähän stressiä ja jotta vältetään mahdolliset vammat. Kun hedelmöitymisestä on kulunut 96 tuntia, sammakonpoikasten olisi täytynyt siirtyä vesikolonnista ja alkaa tarttua säiliöiden seiniin.

Ruokinta

32. Ravinto ja ruokintatiheyden muutos *X. laevis* elinkaaren eri vaiheissa on hyvin tärkeä osa LAGDA-testin protokollaa. Liiallinen ruokinta toukkavaiheen aikana johtaa yleensä

siihen, että skolioosin ilmaantuvuus ja sen vakavuus (lisäys 8) kasvaa, ja tätä pitäisi välttää. Vastaavasti liian vähäinen ruokinta toukkavaiheessa johtaa suuresti vaihtelevaan kehitysnopeuteen kontrolleissa, mikä voi vaarantaa testin tilastollisen voiman tai aiheuttaa virheellisiä testituloksia. Lisäyksessä 4 on kerrottu *X. laevikselle* suositeltu toukka- ja juveniilivaiheen ruokavalio ja ruokinta-aikataulu läpivirtausolosuhteissa, mutta vaihtoehtoja saa käyttää, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti. On tärkeää muistaa, että jos mitataan endokriinisiä päätetapahtumia, ravinnossa ei saa olla endokriinisesti vaikuttavia aineita, kuten soijarehua.

Toukkien ruokinta

33. Toukille suositeltu ruokavalio koostuu lohien kasvatusravinnosta, *Spirulina*-levätableteista ja kultakalan ruoasta (esim. TetraFin[®]-hiutaleet, Tetra, Saksa), jotka sekoitetaan kasvatus- (tai laimennus)veteen. Tätä sekoitusta annetaan kolme kertaa päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin. Sammakonpoikasia ruokitaan myös elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin alkaen päivästä 8 hedelmöittymisen jälkeen. Toukkien ruokinnan on oltava yhdenmukaista jokaisessa testiastiasa, ja sen on mahdollistettava testieläinten asianmukainen kasvu ja kehitys. Näin varmistetaan testintulosten toistettavuus ja siirrettävyys: 1) kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajan on oltava ≤ 45 päivää ja 2) ja kontrolleissa suositeltavan keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulisi olla $1,0 \pm 0,2$ g.

Juveniilien ruokinta

34. Kun muodonvaihdos on tapahtunut, ruokavalio koostuu laadukkaasta uppoavasta sammakonruoasta (esim. Sinking Frog Food -3/32, Xenopus Express, FL, Yhdysvallat) (lisäys 4). Sammakonpoikasille (varhaisvaiheen juveniileille) pelletit jauhetaan nopeasti kahvimyllyssä tai tehosekoittimessa tai murskataan huumareissa survimella niiden koon pienentämiseksi. Kun juveniilit ovat tarpeeksi isoja voidakseen syödä kokonaisia pellettejä, jauhaminen tai murskaaminen ei ole enää tarpeen. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. Juveniilien ruokinnan on mahdollistettava eläinten asianmukainen kasvu ja kehitys: testin päättyessä kontrollien juveniilien suositeltava keskimääräinen paino on $11,5 \pm 3$ g.

Analyyttinen kemia

35. Ennen testin aloittamista testikemikaalin stabiilisuus (ts. liukoisuus, hajoavuus ja haihtuvuus) ja kaikki analyysimenetelmät on määritettävä esimerkiksi saatavilla olevien tietojen tai tietämyksen perusteella. Laimennusvettä annosteltaessa on suositeltavaa analysoida jokaisen rinnakkaisnäytesäiliön testiliuoksen pitoisuus ennen testin aloittamista järjestelmän toimintakyvyn varmistamiseksi. Altistusjaksolla testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten joka viikko vähintään yhdestä jokaisen käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän

rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Myös mitattujen testipitoisuuksien variaatiokertoimen (CV) on oltava 20 prosenttia tai vähemmän koko testin ajan tietyn käsittelyn jokaisen pitoisuuden osalta. Jos mitatut pitoisuudet eivät ole 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta (esimerkiksi testattaessa nopeasti biohajoavia tai adsorptiivisia kemikaaleja), vaikuttavat pitoisuudet on määritettävä ja ilmoitettava suhteessa läpivirtaustestien aritmeettiseen keskiarvopitoisuuteen.

36. Laimennusveden ja varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava sopivin väliajoin (esim. kolme kertaa viikossa) altistuksen koko keston ajan. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joita ei voida havaita kokonaan tai lainkaan nimellispitoisuuksina (esim. koska ne hajoavat tai adsorboituvat testiastioissa nopeasti tai koska ne selvästi kertyvät altistettujen eläimien ruumiisiin), on suositeltavaa mukauttaa jokaisen kammion testiliuoksen vaihtumisnopeus siten, että testipitoisuudet saadaan pidettyä mahdollisimman vakioina.

Havainnot ja päätetapahtumien mittaukset

37. Altistumisen aikana arvioidaan päätetapahtumia, jotka viittaavat toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen, kuten sairauden ja/tai yleistyneen toksisuuden kliiniset merkit), ja kasvuparametreja (pituus ja paino). Lisäksi arvioidaan patologisia päätetapahtumia, jotka voivat liittyä sekä yleistyneeseen toksisuuteen että endokriinisiin vaikutustapoihin, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin reitteihin. Testin päättyessä voidaan lisäksi mitata plasman VTG-pitoisuus valinnaisesti. VTG:n mittaamisesta voi olla hyötyä tutkimustulosten ymmärtämisessä oletettujen hormonaalisten haitta-aineiden endokriinisten vaikutusmekanismien kannalta. Yhteenveto päätetapahtumista ja mittausajankohdista on taulukossa 1.

Taulukko 1: Yhteenveto LAGDA-testin päätetapahtumista

Päätetapahtumat*	Päivittäin	Välinäytteenotto (toukat)	Testin päättyessä (juveniilit)
Kuolleisuus ja poikkeavuudet	X		
Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen		X	
Histo(pato)logia (kilpirauhanen)		X	
Morfometriikka (kasvu painon ja pituuden perusteella)		X	X
Maksan somaattinen indeksi (LSI)			X

Geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde			X
Histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, munuaiset ja maksa)			X
Vitellogeniini (VTG) (valinnainen)			X

* Kaikki päätapahtumat analysoidaan tilastollisesti.

Kuolleisuus ja päivittäiset havainnot

38. Kaikki testisäiliöt on tarkastettava päivittäin kuolleiden eläinten varalta, ja kuolleiden määrä on kirjattava muistiin jokaisesta säiliöstä. Kuolleet eläimet on poistettava testisäiliöstä heti, kun ne havaitaan. Kuolleiden eläinten kehitysvaihe on luokiteltava joko NF-vaihetta 58 edeltäväksi (ennen eturaajan kehittymistä), NF-vaiheiden 58 ja 62 väliseksi, NF-vaiheen 63 ja 66 väliseksi (NF-vaiheen 62 ja pyrstön täydellisen surkastumisen välillä) tai NF-vaiheen 66 jälkeiseksi (toukkavaiheen jälkeinen vaihe). Jos kuolleisuus on yli 20 prosenttia, se saattaa olla merkki epätarkoituksenmukaisista testiolosuhteista tai testikemikaalin selvistä toksisista vaikutuksista. Eläimet ovat yleensä herkimpiä muista kuin kemikaaleista johtuville kuolleisuustapahtumille kehityksen muutaman ensimmäisen päivän aikana kudun jälkeen ja muodonvaihdoksen huippukohdan aikana. Tällainen kuolleisuus voi käydä selvästi ilmi kontrolliaineistosta.
39. Myös mahdolliset havainnot epänormaalista käyttäytymisestä, selvästi nähtävistä epämuodostumista (esim. skolioosi) tai leesioista on kirjattava. Skolioosihavainnot on laskettava (ilmaantuvuus) ja niiden vakavuus on arvioitava (esim. merkityksetön – 0, vähäinen – 1, kohtalainen – 2, vaikea – 3; lisäys 8). On pyrittävä varmistamaan, että kohtalaisen ja vaikean skolioosin esiintyvyys on vähäistä (esim. alle 10 prosenttia kontrolleissa) koko tutkimuksessa, joskaan se, että kontrolleissa esiintyy enemmän poikkeavuuksia, ei välttämättä ole syy lopettaa testiä. Vesikolonissa olevien toukkavaiheen eläinten käyttäytyminen on normaalia, kun niiden pyrstö on päättä korkeammalla, niiden peräevän liike on säännöllisen rytmikästä, ne tulevat ajoittain pintaan, niiden kiduskannet toimivat ja ne reagoivat ärsykkeisiin. Epänormaalia käyttäytymistä on esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjassa makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen ja ärsykkeisiin reagoimattomuus. Muodonvaihdoksen tehneiden eläinten osalta on edellä mainitun epänormaalien käyttäytymisen lisäksi kirjattava myös selvät erot ravinnon kulutuksessa käsittelyjen välillä. Selviä epämuodostumia ja leesioita voivat olla esimerkiksi morfologiset poikkeamat (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), vatsan turvotus, verta vuotavat leesiot sekä bakteeri- tai sieni-infektiot. Juveniilien päässä heti sierainten takana olevat leesiot voivat olla merkki riittämättömästä kosteudesta. Nämä määrytykset ovat laadullisia, ja ne on rinnastettava sairaudesta/stressistä kertoviin kliinisiin merkkeihin.

kontrollieläimiin vertaamalla. Jos näitä merkkejä esiintyy altistussäiliöissä enemmän kuin kontrollisäiliöissä, niitä on pidettävä osoituksena selvästä toksisuudesta.

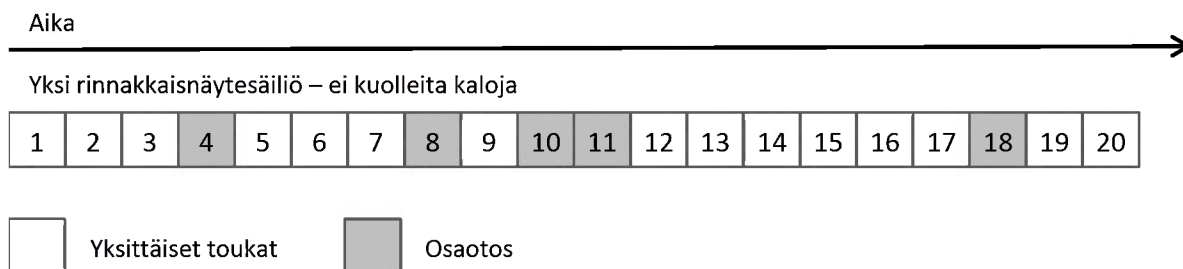
Osaotos toukista

Osaotos toukista pääpiirteissään

40. NF-vaiheen 62 saavuttaneet sammakonpoikaset on otettava pois säiliöistä, ja niistä on joko otettava näytteet tai ne on siirrettävä altistuksen seuraavaan osaan uuteen säiliöön, tai ne on erotettava muista samassa säiliössä olevista sammakonpoikasista fyysisesti väliseinällä. Sammakonpoikaset tarkastetaan päivittäin, ja tutkimuksen se päivä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa NF-vaiheen 62, kirjataan muistiin. Määräävä ominaisuus, jota tässä arvioinnissa käytetään, on pään muoto. Kun pään koko on pienentynyt siinä määrin, että se on silmämääräisesti yhtä leveä kuin sammakonpoikasen muu ruumis, ja kun eturaaja on sydämen keskipisteen tasolla, kyseisen yksilön katsotaan saavuttaneen NF-vaiheen 62.
41. Tavoitteena on ottaa näytteet yhteensä viidestä NF-vaiheen 62 saavuttaneesta sammakonpoikasesta yhtä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti. Tämä tulee tehdä täysin satunnaisesti, mutta siitä on päätettävä etukäteen. Hypoteettinen esimerkki rinnakkaisnäytesäiliöstä on **kuvassa 1**. Jos tietyssä säiliössä on 20 elossa olevaa sammakonpoikasta, kun ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62, väliltä 1–20 on valittava viisi satunnaista numeroa. Sammakonpoikanen nro 1 on ensimmäinen yksilö, joka saavutti NF-vaiheen 62, ja sammakonpoikanen nro 20 on säiliön viimeinen yksilö, joka saavutti tämän vaiheen. Jos säiliössä on 18 elossa olevaa toukkaa, nämä viisi satunnaista numeroa valitaan väliltä 1–18. Tämä on tehtävä jokaiselle rinnakkaisnäytesäiliölle, kun testin ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62. Jos NF-vaiheen 62 näytteenoton aikana havaitaan kuolleita yksilöitä, loput näytteet on satunnaistettava uudelleen sen mukaan, montako toukkaa ei vielä ole NF-vaiheessa 62 ja montako lisänäytettä tarvitaan, jotta kyseisestä rinnakkaisnäytteestä saadaan yhteensä viisi näytettä. Sinä päivänä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa NF-vaiheen 62, katsotaan tehdystä näytteenottokaaviosta, käytetäänkö tätä yksilöä näytteenotossa vai erotetaanko se fyysisesti muista sammakonpoikasista altistuksen jatkuessa. Annetussa esimerkissä (kuva 1) ensimmäinen NF-vaiheen 62 saavuttanut yksilö (ts. laatikko nro 1) erotetaan muista poikasista fyysisesti, sen altistusta jatketaan ja päivä, jona tämä yksilö saavutti NF-vaiheen 62, kirjataan. Yksilöitä nro 2 ja 3 käsitellään samalla tavalla kuin yksilöä nro 1. Yksilöltä nro 4 otetaan näytteet kasvua ja kilpirauhasen histologiaa varten (tässä esimerkissä). Tätä menettelyä jatketaan, kunnes 20. yksilö joko liittyy muihin NF-vaiheen 62 jälkeisessä vaiheessa oleviin yksilöihin tai sitä käytetään näytteenotossa. Tässä on käytettävä sellaista satunnaistamismenetelmää, että jokaisella testin organismilla on yhtäläinen todennäköisyys tulla valituksi. Tämä voidaan saavuttaa millä tahansa satunnaistavalla menetelmällä, mutta

se edellyttää myös, että jokainen sammakonpoikanen joutuu haaviin jossakin kohtaa NF-vaiheen 62 osaotosjaksoa.

Kuva 1: Hypoteettinen esimerkki NF-vaiheen 62 näytteenotosta yhdestä rinnakkaisnäytesäiliöstä.



42. Toukkaosaotoksesta tutkitaan seuraavat päätapahtumat: 1) NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (ts. hedelmöittymisen ja NF-vaiheen 62 välisten päivien lukumäärä), 2) ulkoiset poikkeavuudet, 3) morfometriikka (paino ja pituus) ja 4) kilpirauhasen histologia.

Sammakonpoikasten humaani lopettaminen

43. NF-vaiheen 62 saavuttaneista sammakonpoikasista (5 yksilöä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti) koostuva osajoukko on lopetettava upottamalla ne 30 minuutiksi riittävään määrään (esim. 500 ml:aan) nukutusliuosta (esim. 0,3-prosenttinen MS-222-liuos, trikaiinimetanisulfonaatti, CAS-nro 886-86-2). MS-222-liuos pitää puskuroida natriumbikarbonaatilla siten, että sen pH on noin 7,0, koska puskuroimaton MS-222-liuos on hapanta ja ärsyttää sammakon ihoa, jolloin se imeytyy huonosti ja aiheuttaa eläimille tarpeetonta lisästressiä.
44. Sammakonpoikanen nostetaan testikammioista haavilla ja siirretään (asetetaan) lopetusliuokseen. Eläin on varmasti kuollut ja valmis ruumiinavaukseen, kun se ei reagoi ulkoisiin ärsykkeisiin, kuten takaraajan nipistämiseen pinseteillä.

Morfometriikka (paino ja pituus)

45. Jokaiselta sammakonpoikaselta on punnittava märkápaino (pyöristys lähimpään milligrammaan) ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus (pyöristys lähimpään 0,1 mm:iin) heti, kun sen todetaan olevan reagoimaton nukutusliuoskäsittelyn jälkeen (kuva 2a). Kuonon ja peräaukon välinen pituus voidaan mitata myös valokuvasta kuvien analysointiohjelmalla. Ennen punnitsemista sammakonpoikasista on poistettava liiallinen vesi taputteleamalla ne kuiviksi. Kun koon mittaus (paino ja kuonon ja peräaukon välinen pituus) on tehty, kaikki selvät morfologiset poikkeamat ja/tai toksisuuden kliiniset merkit, kuten skolioosi (ks. lisäys 8), petekiat ja verenpurkaumat, on tallennettava tai kirjattava, ja

digitaalista dokumentointia suositellaan. Petekiat ovat pieniä punaisia tai violetteja verenpurkauksia ihon hiussuonissa.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen

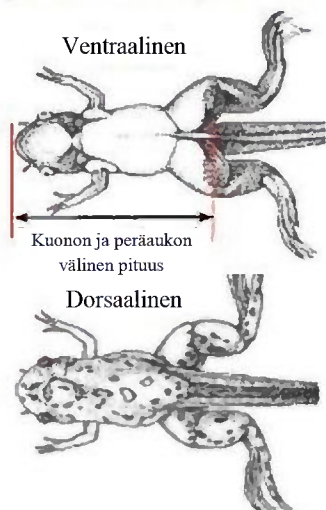
46. Osaotoksen toukkien kilpirauhasille tehdään histologinen arviointi. Eturaajojen jälkeinen alaruumis irrotetaan ja hävitetään. Siistitty muu osa ruumiista kiinnitetään Davidsonin kiinnitysaineella. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Jotta tutkittavat kudokset kiinnittyvät asianmukaisesti, kiinnitysainetta sisältävää astiaa on sekoitettava tai ravistettava sopivalla tavalla. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Kilpirauhasen histologia

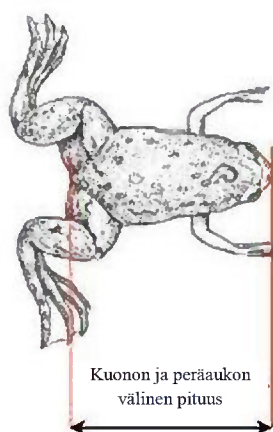
47. Kunkin osaotokseen valitun toukan (kudokset kiinnitetty) kilpirauhanen tutkitaan histologisesti (diagnostinen ja vakavuusasteen arviointi) (29) (30).

Kuva 2: Kuonon ja peräaukon välisen pituuden mittauspisteet LAGDA-testissä NF-vaiheessa 62 (a) ja nuorilta sammakoilta (b). NF-vaiheen 62 määräävät ominaisuudet (a): Pää on yhtä leveä kuin muu ruumis, hajuhermon pituus on lyhyempi kuin hajurauhasen läpimitta (dorsaalisesti katsottuna), ja eturaajat ovat sydämen tasolla (ventraalisesti katsottuna). Kuvat muokattu teoksesta Nieuwkoop ja Faber (1994).

a. Osaotos toukista (NF-vaihe 62)



b. Näytteet juveniileista



Toukkien altistuksen päättäminen

48. Kun otetaan huomioon sammakonpoikasten alkuperäinen määrä, on odotettavissa, että on todennäköisesti pieni prosenttiosuus yksilöitä, jotka eivät kehity normaalisti ja joiden osalta muodonvaihdos (NF-vaihe 66) ei tapahdu kokonaan kohtuullisen ajan kuluessa.

Toukkavaiheen altistus saa kestää enintään 70 päivää. Kaikki tämän ajan jälkeen elossa olevat sammakonpoikaset on lopetettava (ks. 43 kohta). Niiltä on punnittava paino ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus. Lisäksi niiden kehitysvaihe on määritettävä Nieuwkoopin ja Faberin (1994) mukaisesti, ja mahdolliset kehitykselliset poikkeavuudet on merkittävä muistiin.

Karsinta NF-vaiheen 66 jälkeen

49. Jokaisesta säiliöstä kymmenen yksilön on jatkettava testiä NF-vaiheen 66 (pyrstön surkastuminen kokonaan) jälkeen altistuksen päättymiseen saakka. Siksi on tehtävä karsinta sen jälkeen, kun kaikki eläimet ovat saavuttaneet NF-vaiheen 66 tai kun 70 päivää on kulunut (sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin). NF-vaiheen 66 jälkeiset eläimet, joiden altistusta ei jatketa, on valittava satunnaisesti.
50. Eläimet, joita ei valita altistuksen jatkamiseen, lopetetaan (ks. 43 kohta). Jokaisesta eläimestä määritetään kehitysvaihe, punnitaan märkäpaino ja mitataan kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b), ja niille tehdään ruumiinavaus. Fenotyyppiseksi sukupuoleksi (sukurauhasten morfologian perusteella) kirjataan naaras, koiras tai määrittämätön.

Näytteenotto juveniileista

Näytteenotto juveniileista pääpiirteissään

51. Loppujen eläinten osalta altistusta jatketaan siihen saakka, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta laimennusvesikontrollissa (ja/tai liuotinkontrollissa, jos tarpeen). Altistusjakson päättyessä loput eläimet (enintään 10 sammakkoa rinnakkaisnäytettä kohti) lopetetaan, ja seuraavat päätetapahtumat mitataan tai arvioidaan ja niiden tiedot kirjataan: 1) morfometriikka (paino ja pituus), 2) fenotyyppisen/genotyyppisen sukupuolen suhde, 3) maksan paino (maksan somaattinen indeksi), 4) histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, maksa ja munuaiset) ja valinnaisena 5) plasman VTG-pitoisuus.

Sammakoiden humaani lopettaminen

52. Juveniilit eläimet (muodonvaihdon tehneet sammakot) lopetetaan antamalla niille intraperitoneaalinen injektio nukutusainetta (esim. 10-prosenttinen MS-222) asianmukaisessa fosfaattipuskuroidussa liuoksessa. Sammakoilta voidaan ottaa näytteet, kun niistä on tullut reagoimattomia (yleensä noin kahden minuutin kuluttua injektioista, jos 10-prosenttista MS-222-ainetta käytetään annoksella 0,01 ml/g sammakkoa kohden). Vaikka juveniilit sammakot voidaan upottaa pitoisuudeltaan voimakkaaseen nukutusaineeseen (MS-222), kokemus on osoittanut, että niiden lopettaminen tällä tavalla kestää kauemmin, ja sen kesto voi olla epätarkoituksenmukaista näytteenoton kannalta.

Injektio on tehokas ja nopea lopettamiskeino ennen näytteenottoa. Näytteenottoa ei saa aloittaa, ennen kuin sammakoiden reagoimattomuus on varmistettu, jotta on varmaa, että ne ovat kuolleet. Jos sammakoissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissä niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos sammakko lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta sammakko lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Morfometriikka (paino ja pituus)

53. Märkäpaino punnitaan ja kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b) mitataan samalla tavalla kuin toukkaosaotoksessa.

Plasman VTG-pitoisuus (valinnainen)

54. VTG on laajalti hyväksytty biomarkkeri, joka on seurausta estrogeenisille kemikaaleille altistumisesta. LAGDA-testissä plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata juveniilinäytteistä valinnaisesti (tällä voi olla erityistä merkitystä silloin, jos testikemikaalin oletetaan olevan estrogeenin tavoin vaikuttava).
55. Lopetetun juveniilin takaraajat leikataan ja verinäyte kerätään heparinisoituun kapillaariin (myös muita verenkeruumenetelmiä, kuten sydänpunktiota, voidaan käyttää). Veri siirretään mikrosentrifugiputkeen (tilavuus noin 1,5 ml), joka sentrifugoidaan plasman erottelemiseksi. Plasmanäytteet on säilytettävä -70 °C:ssa tai sitä kylmemmässä VTG-pitoisuuden määrittämiseen asti. Plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA) (lisäys 6) tai muulla menetelmällä, esimerkiksi massaspektrometrialla (31). Lajikohtaisten vasta-aineiden käyttöä suositellaan paremman herkkyyden vuoksi.

Geneettisen sukupuolen määrittäminen

56. Jokaisen juveniilin sammakon geneettinen sukupuoli määritetään Yoshimoton ja muiden (11) kehittämien markkereiden perusteella. Geneettisen sukupuolen määrittämistä varten otetaan osa yhdestä dissektion aikana irrotetusta takaraajasta (tai koko raaja) (tai osa muusta kudoksesta) ja laitetaan se mikrosentrifugiputkeen (sammakoiden kudokset voidaan ottaa mistä tahansa kudoksesta). Kudosta voidaan säilyttää -20 °C:ssa tai sitä kylmemmässä deoksiribonukleihinapon (DNA) eristämiseen saakka. DNA voidaan eristää kudoksista kaupallisesti saatavilla olevilla tarvikepaketeilla, ja markkerin olemassaolo tai puuttuminen analysoidaan polymeerasiketjureaktio (PCR) -menetelmällä (lisäys 5). Yleensä histologisen sukupuolen ja genotyypin välinen vastaavuus kontrollieläimillä juveniilivaiheen näytteenotossa kontrolliryhmissä on yli 95 prosenttia.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen histopatologisia tutkimuksia varten

57. Sukurauhaset, sukujohtimet, munuaiset ja maksat irrotetaan histologista analyysia varten lopullisessa näytteenotossa. Eläimen vatsaontelo avataan, ja maksa irrotetaan ja punnitaan. Seuraavaksi poistetaan ruoansulatuselimet (maha, suolet) varovasti vatsan alaosasta, jotta sukurauhaset, munuaiset ja sukujohtimet saadaan näkyviin. Sukurauhasten mahdolliset selvät morfologiset poikkeavuudet on kirjattava muistiin. Lopuksi on irrotettava vielä takaraajat, ellei niitä ole irrotettu jo aiemmin verinäytettä varten. Irrotetut maksat ja ruumiit, joihin sukurauhaset on jätetty paikalleen, on laitettava heti Davidsonin kiinnitysaineeseen. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Histopatologia

58. Jokaiselle juveniilinäytteelle tehdään sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksakudoksen histopatologinen tutkimus (diagnoosi ja vaikeusasteen määrittäminen) (32). Tämän tutkimuksen perusteella johdetaan myös sukurauhasten fenotyyppi (ts. munasarjat, kivekset, intersukupuolisuus), ja näitä havaintoja voidaan geneettisen sukupuolen yksilöllisten määrittysten kanssa käyttää fenotyyppisten/genotyyppisten sukupuolten suhteen laskemiseen.

TIEDOT JA RAPORTOINTI**Tilastanalyysi**

59. LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot (paino, kuonon ja peräaukon välinen pituus, maksan somaattinen indeksi, VTG), 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (time to event) kehitysnopeuden arviointia varten (esim. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneiden päivien määrä testin aloittamisesta) ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista.
60. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC- tai ECx-arvo. Aineiston tilastollisissa analyyseissa (yleensä rinnakkaisnäytteiden keskiarvon perusteella) on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu julkaisussa *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). Tämän testimenetelmän lisäyksessä 4 on suositeltua tilastanalyysia kuvaava päätöksentekokaavio ja ohjeet aineiston käsittelystä sekä sopivimman tilastollisen testin tai mallin valinnasta LAGDA-testissä.

61. Juveniilien näytteenotosta saadut tiedot (esim. kasvu, maksan somaattinen indeksi) on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen, koska se määritetään kaikilta sammakoilta.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen käyttö

62. Rinnakkaisnäytteet ja käsittelyt voivat vaarantua selvästi toksisuudesta johtuvan liiallisen kuolleisuuden, sairauksien tai teknisen virheen vuoksi. Jos käsittely vaarantuu sairauden tai teknisen virheen vuoksi, analyysia varten on oltava kolme vaarantumaton käsittely ja kolme vaarantumaton rinnakkaisnäytettä. Jos selvää toksisuutta ilmenee suurten pitoisuuksien yhteydessä, analyysia varten on oltava mieluiten vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumaton rinnakkaisnäytettä (OECD:n testiohjeissa noudatettavan suurin siedetty pitoisuus -lähestymistavan mukaisesti (34)). Kuolleisuuden lisäksi selvän toksisuuden merkkejä voivat olla käyttäytymiseen kohdistuvat vaikutukset (esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen), morfologiset leesiot (esim. vertavuotavat leesiot, vatsan turvotus) tai normaalin ruokintavasteen estyminen, kun sitä verrataan laadullisesti kontrollieläimiin.

Liuotinkontrolli

63. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset (jos sitä on käytetty). Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissa huomioon otettavat päätapahtumat ovat kasvuparametrit (paino ja pituus), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

Testiraportti

64. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

- fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

- Yhdestä ainesosasta koostuva aine:
 ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet
 kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).
- Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:
 mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

- tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.
- Tiedot skolioosin ilmaantuvuudesta aikaisemmissa kontroллеissa käytetyn varastoviljelmän osalta.

Testiolosuhteet:

- valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)
- testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä, testiorganismien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)
- varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)
- testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumpput, laimennusjärjestelmät)
- menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuutta aidossa liuoksessa
- laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), kokonaisjodipitoisuus, orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset
- nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat
- testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus

- yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

- todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit
 - seuraavat tiedot kontroleista (myös liuotinkontrollista, jos sitä on käytetty) ja käsittelyryhmistä: havaittu kuolleisuus ja poikkeavuus, NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika, kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (vain toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (vain juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde (vain juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologisen tutkimuksen tulokset (vain juveniilinäytteistä) ja plasman VTG-pitoisuus (vain juveniilinäytteistä, jos VTG-näyte on otettu)
 - tilastollisessa analyysissä ja tietojen käsittelyssä sovellettu lähestymistapa (käytetty tilastollinen testi tai malli)
 - pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä
 - pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä ($\alpha = 0,05$) tarvittaessa ECx kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet
 - mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.
65. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).
66. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut mediaani aika on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana. Käsittelyjen osalta myös käsittelyn keston mediaani on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana.

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16–27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Tämän liitteen C.4 luku, Biohajoavuuden määrittäminen.
- (18) Tämän liitteen C.29 luku, Biohajoavuuden määrittäminen – CO₂ suljetuissa astioissa (Headspace-testi).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Tämän liitteen luku C.38, Sammakkoeläinten muodonvaihdestutkimus
- (26) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus
- (27) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi
- (28) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.
- (31) Luna LG and Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197–202.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Apikaalinen päätetapahtuma: Aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla.

Kemikaali: Aine tai seos

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

EC_x: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC₅₀ on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

phj: Päivää hedelmöittymisen jälkeen

Läpivirtaustesti: Testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistusjakson ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Tästä on ohjeita lisäyksessä 7.

Mediaani tappava pitoisuus (LC₅₀): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

Lisäys 2**JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISTIA OMINAISUUKSIA**

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyyliden 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**LAGDA-TESTIN TESTAUSOLOSUHTEET**

1. Testilajit	<i>Xenopus laevis</i>
2. Testityyppi	Jatkuva läpivirtaus
3. Veden lämpötila	Nimellislämpötila on 21 °C. Keskimääräinen lämpötila testin keston ajan on 21 ± 1 °C (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 1,0 °C)
4. Valaistus	Loisteputket (laajakirjoiset) 600–2 000 luksia (luumenia/m ²) veden pinnassa
5. Valojaksot	12 h valoisaa : 12 h pimeää
6. Testiliuoksen määrä ja testiastia (säiliö)	4–10 l (vedensyvyys vähintään 10–15 cm) Lasinen tai ruostumattomasta teräksestä valmistettu säiliö
7. Testiliuosten vaihtuvuus	Jatkuva, otettava huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpito että kemikaalille altistus (esim. 5 vaihtoa päivässä)
8. Testiorganismien ikä testin alkaessa	Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaihe 8–10
9. Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä	20 eläintä (alkiota) / säiliö (rinnakkaisnäyte) altistuksen alkaessa ja 10 eläintä (juveniilia) / säiliö (rinnakkaisnäyte) NF-vaiheen 66 jälkeen altistuksen lopettamiseen asti
10. Käsittelyjen lukumäärä	Vähintään 4 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t)
11. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä	4 rinnakkaisnäytettä testikemikaalikäsittelyä kohti ja 8 rinnakkaisnäytettä kontrollia (kontrolleja) kohti
12. Organismien lukumäärä testipitoisuutta kohti	Vähintään 80 eläintä testikemikaalikäsittelyä kohti ja vähintään 160 rinnakkaisnäytettä kontrollia (kontrolleja) kohti
13. Laimennusvesi	Mikä tahansa vesi, jossa <i>X. laevis</i> voi kasvaa ja kehittyä normaalisti (esim. lähdevesi tai aktiivihiihliuodatettu hanavesi)
14. Ilmastus	Ei tarvita, mutta säiliöt voidaan joutua ilmastamaan, jos liuenneen hapen pitoisuus pienenee suositellun rajan alle ja suurenee, kun testiliuoksen virtaus maksimoidaan.
15. Liuenneen hapen pitoisuus testiliuoksessa:	Liuennot happi: ≥ 40 % ilman kyllästysarvosta tai $\geq 3,5$ mg/l

16. Testiliuoksen pH-arvo	6,5–8,5 (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5)
17. Testiliuoksen kovuus ja emäksisyys	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Ruokinta	(Ks. lisäys 4)
19. Altistusaika	NF-vaiheesta 8–10 siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta vesi- ja/tai liuotinkontrolliryhmässä (enintään 17 viikkoa)
20. Biologiset päätetapahtumat	Kuolleisuus (ja havaitut poikkeavuudet), NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (toukkanäytteistä), kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyypin sukupuolen suhde (juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologia (juveniilinäytteistä) ja plasman vitellogeniinipitoisuus (juveniilinäytteistä, valinnainen)
21. Testin validiteettikriteerit	Liuenneen hapen pitoisuuden on oltava > 40 % ilman kyllästysarvosta; veden lämpötilan on oltava 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla < 1,0 °C; testiliuoksen pH-arvon on oltava 6,5–8,5; kontrolleissa kuolleisuuden on oltava ≤ 20 % kussakin rinnakkaisnäytteessä, ja kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneen ajan on oltava keskimäärin ≤ 45 päivää; testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) $1,0 \pm 0,2$ g ja testin lopettamisvaiheessa $11,5 \pm 3$ g; saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Lisäys 4

RUOKINTA

Vaikka suositellaan tällaista ruokintaa, myös muut vaihtoehdot ovat hyväksyttäviä, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti.

Toukkien ruokinta

Toukkien ravinnon valmistus

- A. 1:1 (v/v) lohien kasvatusravintoa: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote);
1. lohien kasvatusravinto: 50 grammaa lohien kasvatusravintoa (pieniä rakeita tai jauhetta) ja 300 ml sopivaa suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 20 sekunnin ajan
 2. Levä/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitus: 12 g spirulina-levätabletteja ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 40 sekunnin ajan; 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan, ja nämä sekoitukset yhdistetään, jolloin saadaan 1 litra sekoitusta, joka sisältää 12 g spirulina-levää ja 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) litrassa.
 3. Yhdistä yhtä suuret määrät sekoitettua lohien kasvatusravintoa ja levä-/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitusta.
- B. Suolalehtijalkaiset:

15 ml suolalehtijalkaisten munia annetaan kuoriutua 1 litraan suolavettä (joka valmistetaan lisäämällä 20 ml NaCl:ää yhteen litraan deionisoitua vettä). Kun liuosta on ilmastettu 24 tuntia huoneenlämmössä jatkuvassa valossa, suolalehtijalkaiset kerätään. Niiden annetaan asettua 30 minuutin ajan lopettamalla ilmastus. Säiliön pinnalla kelluvat rakkulat kerätään pois ja hävitetään. Suolalehtijalkaiset kaadetaan asianmukaisten suodattimien läpi ja lisätään 30 ml:aan suodatettua vettä.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 1 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan altistuksen aikana toukkavaiheissa. Eläimiä on ruokittava kolmesti päivässä maanantaista perjantaihin ja kerran päivässä viikonloppuisin.

Taulukko 1: *X. laevis* -toukkien ruokinta läpivirtausolosuhteissa

Aika* (hedelmöittymisen jälkeen)	Lohien kasvatusravinto: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote)		Suolalehtijalkaiset	
	Arkipäivä (3 kertaa päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)	Arkipäivä (kahdesti päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)
Päivät 4–14 (viikoilla 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (päivät 8–15)	0,5 ml (päivät 8–15)
Viikko 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (päivästä 16 alkaen)	1 ml (päivästä 16 alkaen)
Viikko 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Viikko 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Viikko 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Viikko 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikko 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikot 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Päivä 0 on se päivä, jona hCG-injektio annetaan.

Ruokavalio siirryttäessä toukkavaiheesta juveniilivaiheeseen

Kun toukkien muodonvaihdos on valmis, niille aletaan antaa jäljempänä kuvattua juveniilien ravintoa. Tässä siirtymävaiheessa toukkien ravintoa on vähennettävä, koska juveniilien ravintomäärä lisääntyy. Tämä voidaan tehdä vähentämällä toukkien ravintoa ja lisäämällä juveniilien ravintoa suhteessa sen mukaan, miten kukin viiden sammakonpoikasen ryhmä ohittaa NF-vaiheen 62 ja miten niiden muodonvaihdos tulee valmiiksi NF-vaiheessa 66.

Juveniilien ruokinta*Juveniilien ravinto*

Kun muodonvaihdos on valmis (vaihe 66), ravinnoksi vaihdetaan pelkästään 3/32 tuuman laadukas uppoava sammakonruoka (Xenopus ExpressTM, FL, Yhdysvallat) tai vastaava tuote.

Murskattujen pellettien valmistaminen toukka- ja juveniilivaiheiden siirtymäkohdassa

Uppoavat sammakonruokapelletit laitetaan hetkeksi kahvimyllyyn, tehosekoittimeen tai huhmareeseen, jotta niiden kokoa saadaan pienennettyä noin kolmanneksen. Pellettejä ei tule kuitenkaan käsitellä niin kauan, että niistä tulee jauhetta.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 2 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan elinkaaren juveniili- ja aikuisvaiheissa. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. On kuitenkin muistettava, että kun eläimet tekevät muodonvaihdosta, suolalehtijalkaisten antamista jatketaan siihen asti, kunnes muodonvaihdos on valmis > 95 prosentilla eläimistä.

Eläimiä ei ruokita testin päättymispäivänä, jotta ravinto ei vaikuta painon punnitsemiseen.

Taulukko 2: *X. laevis* -juveniilien ruokinta läpivirtausolosuhteissa. Huom. Ne eläimet, joiden muodonvaihdos ei ole tapahtunut tai joilla se on viivästynyt kemikaalikäsittelyn takia, eivät voi syödä kokonaisia pellettejä.

Aika (Viikkoa muodonvaihdoksen mediaanin päivän jälkeen)	Murskattujen pellettien määrä (mg/sammakko)	Kokonaisten pellettien määrä (mg/sammakko)
Kun eläinten muodonvaihdos on valmis	25	0
Viikot 0–1	25	28
Viikot 2–3	0	110
Viikot 4–5	0	165
Viikot 6–9	0	220

* Viikon 0 ensimmäinen päivä on kontrollieläinten muodonvaihdoksen mediaani päivä.

Lisäys 5

GENEETTISEN SUKUPUOLEN MÄÄRITYS

Xenopus laevis geneettisen sukupuolen määrittämisen menetelmä perustuu julkaisuun Yoshimoto ja muut., 2008. Yksityiskohtaiset genotyyppitysmenettelyt voi katsoa tästä julkaisusta tarvittaessa. Vaihtoehtoisia menetelmiä (esim. suuren kapasiteetin qPCR) voidaan käyttää, jos ne katsotaan sopiviksi.

X. laevisen alukkeet

DM-W-markkeri

Forward-aluke: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse-aluke: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiivinen kontrolli

Forward-aluke: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse-aluke: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA:n puhdistaminen

Puhdista DNA lihas- tai ihokudoksesta käyttämällä esimerkiksi Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (luettelonro 69506) -tarvikepakettia tai vastaavaa tuotetta paketin ohjeiden mukaisesti. DNA voidaan uuttaa spin-kolonneista käyttämällä vähemmän puskuria, jolloin saadaan konsentroituneempia näytteitä, jos se on tarpeen PCR:n osalta. DNA on melko vakaata, joten on toimittava varovasti, jotta vältetään ristikontaminaatio, joka voi johtaa siihen, että koiraat määritetään virheellisesti naaraiksi tai päinvastoin.

PCR

Taulukossa 1 kuvataan näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart™ *Taq* -polymeraasia

Taulukko 1: Näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart™ *Taq* -polymeraasia

Master mix -reaktioseokset	1x (µl)	[Lopullinen]
NFW	11	-
10X-puskuri	2,0	-

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP:t (10 mM kutakin)	0,4	200 µM
Alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 yksikköä/µl
DNA-templaatti	1,0	~ 200 pg/µl

Huom. Kun teet master mix -seoksia, tee aina hieman ylimääräistä, koska pipetoinnin aikana määrästä voi hävitä osa (esimerkki: 25x tulee käyttää vain 24 reaktioon).

Reaktio:

Master mix 19,0 µl

Templaatti 1,0 µl

Yhteensä 20,0 µl

Termosyklerin profiili:

Vaihe 1. 94 °C 1 min

Vaihe 2. 94 °C 30 s

Vaihe 3. 60 °C 30 s

Vaihe 4. 72 °C 1 min

Vaihe 5. Siirry vaiheeseen 2. 35 sykliä

Vaihe 6. 72 °C 1 min

Vaihe 7. 4 °C pito

PCR-tuotteet voidaan ajaa heti geelissä tai säilyttää 4 °C:ssa.

Agaroosigelelektroforeesi (3 %) (näyteprotokolla)

50X TAE

Tris 24,2 g

Jääetikka 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Lisää vettä 100 ml:aan asti

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3:1-agarooosi

3 osaa NuSieve™ GTG™ -agarooisia

1 osa Fisherin agarooisia, matala elektroendosmoosi (EEO)

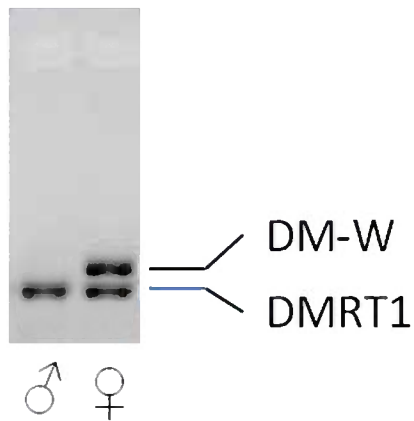
Menetelmä

1. Valmista 3-prosenttinen geeli lisäämällä 1,2 g agarooisisekoitusta 43 ml:aan 1X TAE:ta. Sekoita hyvin, jotta suuret kokkareet hajoavat.
2. Kuumenna agarooisiseosta mikroaaltouunissa, kunnes se on liuennut kokonaan (mutta älä ylikuumenna sitä). Anna seoksen jäähtyä hetki.
3. Lisää siihen 1,0 µL etidiumbromidia (10 mg/ml). Ravista pulloa. Huomaa, että etidiumbromidi on mutageenista. Siksi tässä vaiheessa tulee käyttää vaihtoehtoisia kemikaaleja, mikäli se on teknisesti suinkin mahdollista, jotta työntekijöihin kohdistuvat terveysriskit olisivat mahdollisimman pienet¹.
4. Kaada geeli muottiin sopivan työkalun avulla. Anna geelin jäähtyä kunnolla.
5. Lisää geeli laitteeseen. Peitä geeli 1X TAE:llä.
6. Lisää 1 µl 6x näytekupkuria aina 10 µl:aan PCR-tuotetta.
7. Pipetoi näytteet kuoppiin.
8. Käytä laitetta 160 V:n vakiojännitteellä noin 20 minuutin ajan.

Kuvassa 1 on agarooisigeelikuva, jossa näkyy koiras- ja naarasyksilöitä tarkoittavat juosteet.

¹ Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2004/37/EY, annettu 29 päivänä huhtikuuta 2004, työntekijöiden suojelemisesta syöpäsairauden vaaraa aiheuttaville tekijöille tai perimän muutoksia aiheuttaville aineille altistumiseen työssä liittyviltä vaaroilta (kuudes neuvoston direktiivin 89/391/ETY 16 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu erityisdirektiivi) (EUVL L 158, 30.4.2004, s. 50), 4 artiklan 1 kohta.

Kuva 1: Agaroosigeelikuva, jossa näkyy koirasyksilöä (♂) tarkoittava juoste (yksi juoste ~203 bp: DMRT1) ja naarasyksilöä (♀) tarkoittava juoste (kaksi juostetta ~259 bp: DM-W ja 203 bp:DMRT1).



LÄHDEKIRJALLISUUS

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

Lisäys 6

VITELLOGENIININ MITTAUS

Vitellogeniinin (VTG) mittausta tehdään entsyymivälitteisellä immunosorbenttimääritys (ELISA) -menetelmällä, joka kehitettiin alun perin rasvapäämutun VTG:n mittaamiseen (Parks ja muut, 1999). Tällä hetkellä *X. laevikselle* ei ole kaupallisesti saatavia vasta-aineita. Koska tästä proteiinista on kuitenkin runsaasti tietoa ja koska kustannustehokkaita kaupallisia vasta-aineiden tuotantopalveluja on hyvin saatavilla, laboratoriot voivat kohtuullisen helposti kehittää ELISA-määrityksen tämän mittauksen tekemistä varten (Olmstead ja muut, 2009). Julkaisussa Olmstead ja muut (2009) kuvataan myös testi, joka on muokattu *X. tropicaliksen* VTG-mittausta varten (ks. jäljempänä). Menetelmässä käytetään *X. tropicaliksen* VTG:lle valmistettua vasta-ainetta, mutta sen tiedetään toimivan myös *X. laeviksen* VTG:lle. Myös ei-kilpailevia ELISA-määrityksiä voidaan käyttää; niissä voi kuitenkin olla pienemmät havaintorajat kuin jäljempänä selostetussa menetelmässä.

Materiaalit ja reagenssit

- Preadsorboitu 1. vasta-aineseerumi

Sekoita 1 osa anti-*X. tropicalis* VTG 1. vasta-aineseerumia ja 2 osaa kontrollikoiraan plasmaa. Anna seoksen olla huoneenlämmössä ~ 75 minuuttia, laita se jäähauteeseen 30 minuutiksi ja sentrifugoi (> 20K x G) 1 tunti 4 °C:ssa. Poista supernatantti, tee alikvootit ja säilö -20 °C:seen.

- 2. vasta-aine

Goat Anti-Rabbit IgG-HRP -konjugaatti (esim. Bio-Rad 172-1019)

- VTG-standardi

Puhdistettu *X. laeviksen* VTG, pitoisuus 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiini) (esim. KPL 50-76-00 tai Sigma T0440)
- Vuohen normaaliseerumi (NGS) (esim. Chemicon® S26-100 ml)
- 96-kuoppaisia EIA-polystyreenimikrotiitterilevyjä (esim. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- 37 °C:n hybridisaatiouuni (tai nopeasti tasapainottuva elatuskaappi) levyille, vesihaude putkille
- Muut tavalliset laboratoriolaitteet, kemikaalit ja tarvikkeet.

Valmistusohjeet

Pinnoituspuskuri (50 mM karbonaattipuskuria, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na ₂ CO ₃	0,68 g
Vesi	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfaattia, 1,5 M NaCl:ää):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
Vesi	810 ml

Pesupuskuri (PBST):

10X PBS	100 ml
Vesi	900 ml

Säädä pH-arvoksi 7,3 1 M:lla HCl:ää ja lisää sen jälkeen 0,5 ml Tween-20:tä

Testipuskuri:

Vuohen normaaliseerumi (NGS)	3,75 ml
Pesupuskuri:	146,25 ml

Näytteiden kerääminen

Verinäytteet kerätään heparinisoituun mikrohematokriittiputkeen ja asetetaan jäähauteeseen. Putkia sentrifugoidaan 3 minuuttia, jonka jälkeen ne pisteytetään ja avataan, ja plasma siirretään 0,6 ml:n mikrosentrifugiputkiin, jotka sisältävät 0,13 yksikköä kylmäkuivattua aprotiniiniä. (Nämä putket valmistellaan etukäteen laittamalla niihin tarvittava määrä aprotiniiniä. Sen jälkeen ne jäädytetään ja kylmäkuivataan pikavakuukylmäkuivaajassa matalalla lämmöllä, kunnes ne ovat kuivat.) Säilytä plasma -80 °C:ssa analysointiin saakka.

Menettely yhdelle levyille

Levyn pinnoittaminen

Sekoita 20 µl puhdistettua VTG:tä ja 22 ml karbonaattipuskuria (lopullinen 3 µg/ml). Lisää 200 µl jokaiseen 96-kuoppaisen levyn kuoppaan. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua yön yli 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4 °C:ssa yön yli).

Levyn estäminen

Estoliuos valmistetaan lisäämällä 2 ml vuohen normaaliseerumia (NGS:ää) 38 ml:aan karbonaattipuskuria. Poista pinnoitusliuos ja kuivaa ravistamalla. Lisää jokaiseen kuoppaan 350 µl estoliuosta. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua yön yli 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4 °C:ssa yön yli).

Vertailustandardien valmistaminen

5,8 µl puhdistettua VTG-standardia sekoitetaan 1,5 ml:aan testipuskuria boorilasista valmistetussa kertakäyttöisessä testiputkessa (12 x 75 mm). Näin saatava pitoisuus on 12 760 ng/ml. Sen jälkeen tehdään sarjalaimennus, jossa 750 µl edellisestä laimennoksesta lisätään 750 µl:aan testipuskuria, jolloin saadaan nämä loppupitoisuudet: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

Näytteiden valmistelu

Aloita laimentamalla plasma testipuskuriin suhteessa 1:300 (yhdistä esimerkiksi 1 µl plasmaa ja 299 µl testipuskuria) tai 1:30. Jos odotetaan suurta VTG-pitoisuutta, lisälaimennokset tai suuremmat laimennokset voivat olla tarpeen. Yritä pitää B/B₀ vertailustandardien mukaisina. Käytä laimennussuhdetta 1:30 niissä näytteissä, joissa VTG-pitoisuus on vähäinen, kuten kontrollikoirailla ja -naarailla (naaraista kaikki ovat epäkypsiä). Tätä vähemmän laimennetuissa näytteissä voi näkyä ei-toivottuja matriisivaikutuksia.

Lisäksi on suositeltavaa ajaa positiivinen kontrollinäyte jokaiselle levyille. Se tehdään plasmavarannosta, jonka VTG-pitoisuus on suuri. Varanto laimennetaan ensin NGS:llä, jaetaan alikvootteihin ja säilötään -80 °C:ssa. Jokaisen levyn osalta sulatetaan yksi alikvootti, joka laimennetaan testipuskurilla ja käsitellään testinäytteen tavoin.

Inkubointi 1. vasta-aineella

1. vasta-aine valmistetaan tekemällä preadsorboidusta 1. vasta-aineseerumista laimennos testipuskurissa suhteessa 1:2 000 (ts. 8 µl 16 ml:aan testipuskuria). Yhdistä sen jälkeen 300 µl 1. vasta-ainetta sisältävää liuosta 300 µl:aan näytettä/vertailustandardia lasiputkessa. Tee B₀-putki samalla tavalla 300 µl:sta testipuskuria ja 300 µl:sta vasta-ainetta. Myös NSB-putki on valmistettava samalla tavalla käyttämällä vain 600 µl testipuskuria (eli ei siis vasta-ainetta). Peitä putket Parafilmillä ja sekoita ne varovasti kääntelemällä. Inkuboi putkia 37 °C-asteisessa vesihauteessa noin tunti.

Levyn peseminen

Pese levy hieman ennen kuin 1. vasta-aineen inkubointi tulee valmiiksi. Tyhjennä levy ja taputtele se kuivaksi imupaperilla. Täytä kuopat 350 µl:lla pesuliuosta, tyhjennä ne ja taputtele levy kuivaksi. Tässä monikanavainen toistopipetti tai levynpesuri on hyödyllinen. Pesuvaihe toistetaan vielä kaksi kertaa (pesuja tehdään siis yhteensä kolme).

Levyn täyttäminen

Kun levy on pesty, ota putket pois vesihauteesta ja kääntelee niitä kevyesti. Lisää 200 µl jokaisesta näytteestä, vertailustandardista, B₀- ja NSB-putkista levyn kuoppiin (kaksi rinnakkaisnäytettä). Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua 37 °C:ssa 1 tunnin ajan.

Inkubointi 2. vasta-aineella

Edellisen vaiheen inkuboinnin päätyttyä levy on taas pestävä kolme kertaa samalla tavalla kuin edellisellä kerralla. Laimennettu 2. vasta-aine valmistetaan sekoittamalla 2,5 µl 2. vasta-ainetta ja 50 ml testipuskuria. Lisää 200 µl laimennettua 2. vasta-ainetta jokaiseen kuoppaan, peitä levy kuten edellä ja inkuboi sitä 1 tunti 37 °C:ssa.

Substraatin lisääminen

Kun 2. vasta-aineella inkubointi on päättynyt, pese levy taas kolme kertaa edellä kuvatun mukaisesti. Lisää sen jälkeen jokaiseen kuoppaan 100 µl TMB-substraattia. Anna reaktion kehittyä 10 minuutin ajan mieluiten kirkkaalta valolta suojattuna. Lopeta reaktio lisäämällä 100 µl fosforihappoa (1 M). Tämä muuttaa värin sinisestä voimakkaan keltaiseksi. Mittaa absorbanssi 450 nm:n alueella levylukijalla.

B/B₀-arvon laskeminen

Vähennä keskimääräinen NSB-arvo kaikista mittausarvoista. Jokaisen näytteen ja standardin B/B₀-arvo lasketaan jakamalla absorbanssiarvo (B) B₀-näytteen keskimääräisellä absorbanssilla.

Standardikäyrän luominen ja tuntemattomien määrien määrittäminen

Luo standardikäyrä jollakin grafiikkaohjelmalla (esim. SlidewriteTM tai Sigma Plot[®]), jolla voidaan ekstrapoloida määrä näytteen B/B₀-arvosta standardien B/B₀-arvon perusteella. Yleensä määrä piirretään logaritmisella asteikolla, ja käyrä on S-kirjaimen muotoinen. Se voi kuitenkin näyttää lineaariselta, kun käytetään standardeja, joiden vaihteluväli on pieni. Asianmukainen näyte vastaa laimennuskerrointa ja ilmoitetaan muodossa ”milligrammaa vitellogeniinia millilitrassa plasmaa”.

Minimihavaintorajojen määrittäminen

Usein on epäselvää, miten pieniin arvoihin perustuvat tulokset ilmoitetaan, varsinkin normaalien koiraiden osalta. Näissä tapauksissa on käytettävä 95 prosentin luottamusvälejä sen määrittämiseksi, tuleeko arvo ilmoittaa nollana vai jonakin toisena lukuna. Jos näytteen tulos on nollastandardin (B₀) luottamusvälin sisällä, tulos on ilmoitettava nollana. Minimihavaintoraja on pienin vertailustandardi, joka on jatkuvasti eri kuin nollastandardi; nämä kaksi luottamusväliä eivät siis mene päällekkäin. Sellaisesta näytetuloksesta, joka on minimihavaintorajan luottamusvälin sisällä tai sitä suurempi, ilmoitetaan laskettu arvo. Jos näytteen tulos on nollastandardin ja minimihavaintorajan välissä, kyseisen näytteen arvoksi on ilmoitettava puolet minimihavaintorajasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113–125.

Lisäys 7

TILASTOANALYYSI

LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (esim. aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen) kehitysnopeuden arviointia varten ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista. LADGA-testiä varten suositeltu tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio on kuvassa 1. Jäljempänä esitetään myös muutamia huomautuksia, jotka voivat olla tarpeen, kun tehdään tilastollista analyysia LAGDA-testin mittauksista. Analyysin päätöksentekokaaviossa tulokset kuolleisuuden, kasvun (paino ja pituus) ja maksan somaattisen indeksin mittauksista tulee analysoida ”Muut päätetapahtumat” -kohdan mukaan.

Jatkuvat tiedot

Jatkuvia päätetapahtumia koskevista tiedoista on ensimmäiseksi tarkistettava monotonisuus tekemällä tietojen arvojärjestysmuunnos, sovittamalla ne ANOVA-malliin ja vertailemalla lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos tiedot ovat monotonisia, on tehtävä askeltava Jonckheere-Terpstran testi rinnakkaisnäytteiden mediaaneilla, eikä muita analyyseja tule tehdä. Vaihtoehtoinen testi tiedoille, jotka ovat normaalijakauman mukaisia ja joissa on homogeeninen varianssi, on askeltava Williamsin testi. Jos tiedot eivät ole monotonisia (kvadraattinen kontrasti on merkitsevä mutta lineaarinen ei), tiedot on analysoitava sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallilla. Sen jälkeen tiedoista on arvioitava normaalius (mieluiten Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testillä) ja varianssin homogeenisuus (mieluiten Levenen testillä). Molemmat testit tehdään sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin jäännöksillä. Näiden virallisten normaaliutta ja varianssin homogeenisuutta koskevien testien sijasta voidaan käyttää myös asiantuntijan arvioita, joskin ensisijaisesti tulee käyttää virallisia testejä. Jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssi on homogeeninen, sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin oletukset toteutuvat ja merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnettin testillä. Jos taas tuloksena todetaan epänormaalius tai varianssin heterogeenisuus, Dunnettin testin oletuksia eivät toteudu ja on käytettävä normalisoivaa, varianssia stabiloivaa muunnosta. Jos tällaista muunnosta ei löydy, merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnin testillä. Mikäli mahdollista, on tehtävä ensisijaisesti yksisuuntainen testi kaksisuuntaisen testin sijasta, joskin sen määrittäminen, kumpi on tarkoituksenmukaisempi tietyn päätetapahtuman osalta, edellyttää asiantuntijan arviota.

Kuolleisuus

Kuolleisuustiedot on analysoitava koko testin käsittävältä aikajaksolta, ja ne on ilmoitettava tietyssä säiliössä kuolleiden eläinten osuutena. Sammakonpoikasia, joiden muodonvaihdos ei tapahdu tietyn ajan kuluessa, niitä sammakonpoikasia, jotka ovat toukkien osaotokohortissa, niitä juveniileja, jotka karsitaan, ja kaikkia eläimiä, jotka kuolevat tutkimuksen tekijän virheen vuoksi, on käsiteltävä sensuroituina tietoina, eivätkä ne sisälly

prosenttiosuuksien laskennan nimittäjään. Ennen tilastollisten analyysien tekemistä kuolleisuusosuuksille on tehtävä arkussini-neliöjuurimuunnos. Vaihtoehtona on käyttää askeltavaa Cochran-Armitagen testiä mahdollisesti Rao-Scottin mukautuksella ylidispersion yhteydessä.

Paino ja pituus (kasvutiedot)

Koiraat ja naaraat eivät ole sukupuolisesti dimorfisia muodonvaihdoksen aikana, joten toukkaosaotoksen kasvutiedot on analysoitava sukupuolesta riippumatta. Juveniilien kasvutiedot on kuitenkin analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella. Näiden päätetapahtumien osalta log-muunnos voi olla tarpeen, koska kokotietojen log-normaalius ei ole epätavallista.

Maksan somaattinen indeksi (LSI)

Maksan painot on normalisoitava osuudeksi ruumiin kokonaispainosta (ts. maksan somaattinen indeksi) ja analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella.

Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen

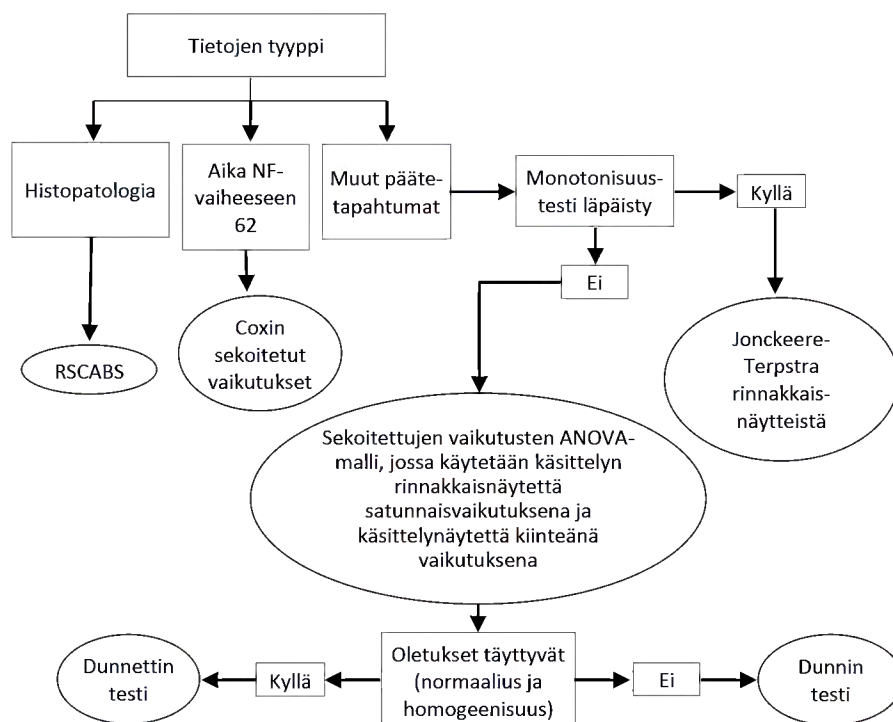
Muodonvaihdosvaiheen saavuttamiseen kulunutta aikaa koskevia tietoja on käsiteltävä time to event -tietoina. Mahdollisia kuolleita eläimiä tai yksilöitä, jotka eivät saavuttaneet 70 päivän kuluessa NF-vaihetta 62, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina (ts. todellinen arvo on suurempi kuin 70 päivää, mutta tutkimus päättyy, ennen kuin eläimet olivat saavuttaneet 70 päivässä NF-vaiheen 62). Testin päättymispäivä on määritettävä sen mediaaniajan perusteella, jona NF-vaihe 62 päättyi laimennusvesikontrollin eläinten osalta, kun muodonvaihdos tuli valmiiksi. Muodonvaihdoksen valmiiksi tuleminen mediaaniaika voidaan määrittää Kaplan-Meierin rajatuloestimaateilla. Tämä päätetapahtuma on analysoitava käyttämällä sekoitettujen vaikutusten Coxin suhteellisen vaaran mallia, jossa otetaan huomioon se, että tutkimuksessa käytettiin rinnakkaisnäytteitä.

Histopatologiset tiedot (vaikeusasteet ja kehitysvaiheet)

Histopatologiset tiedot esitetään vaikeusasteina tai kehitysvaiheina. Testissä nimeltä RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) käytetään askeltavaa Rao-Scottin mukauttamaa Cochran-Armitagen trenditestiä jokaisella histopatologisen vasteen vaikeusastetasolla (Green ja muut, 2014). Rao-Scottin mukautuksella saadaan kokeen rinnakkaisnäytteisiin perustuva rakenne mukaan testiin. ”By Slices” -menettelyssä otetaan huomioon biologinen odotus, että vaikutuksen vakavuus yleensä suurenee annosten tai pitoisuuksien kasvaessa, mutta samalla siinä huomioidaan myös yksittäistä yksilöä koskevat pisteet ja näytetään kaikkien havaittujen vaikutusten vakavuus. Sen lisäksi, että RSCABS-menettelyssä määritetään, mitkä käsittelyt eroavat kontroleista tilastollisesti (ts. joissa patologiset vaikutukset ovat vakavampia kuin kontroleissa), siinä määritetään myös, millä vaikeusasteella ero ilmenee. Näin tästä menettelystä saadaan analyysissä erittäin tarpeellista kontekstietoa. Kun arvioidaan sukurauhasten ja sukujohtimien kehitysvaihetta, tietoihin on sovellettava lisäkäsittelyä, koska RSCABS-menetelmässä oletuksena on, että vaikutuksen

vakavuus suurenee annoksen mukaan. Havaittu vaikutus voi olla kehityksen viivästyminen tai nopeutuminen. Kehitysvaiheen arviointia koskevia tietoja on siis analysoitava ilmoitetun mukaisesti, jotta havaitaan kehityksen nopeutuminen, ja sen jälkeen ne on muunnettava manuaalisesti ennen toista analyysia, jotta havaitaan kehityksen viivästyminen.

Kuva 1: LAGDA-testin tietojen tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio



LÄHDEKIRJALLISUUS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108–1116.

Lisäys 8

NÄKÖKOHTIA SKOLIOOSIN HAVAITSEMISEEN JA SEN ILMAANTUMISEN MINIMOIMISEEN

Idiopaattinen skolioosi, joka näkyy *X. laeviksen* poikasilla yleensä ”taipuneena pyrstönä”, voi vaikeuttaa testipopulaatioiden morfologian ja käyttäytymisen havainnointia. Siksi on syytä pyrkiä minimoimaan tai eliminoimaan skolioosin ilmaantuminen sekä kantapopulaatiossa että testiolosuhteissa. Lopullisessa testissä keskivaikean ja vaikean skolioosin esiintyvyyden tulee olla vähemmän kuin 10 prosenttia. Tämä lisää luottamusta siihen, että testillä voidaan havaita käsittelyyn liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat muuten terveiden sammakkoeläinten toukkien kehitykseen.

Lopullisen testin päivittäisen havainnoinnin aikana on kirjattava sekä skolioosin ilmaantuvuus (yksilöiden määrä) että vaikeusaste, jos skolioosia havaitaan. Poikkeavuuden luonne on kuvattava käyryyden sijainnin (ts. peräaukon edessä vai takana) ja suunnan (ts. lateraalinen vai dorsaaliseen ventraaliseen) osalta. Vaikeusaste voidaan arvioida seuraavasti:

Merkityksetön: ei käyryyttä

- 1) Vähäinen: lievä lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä vain eläimen ollessa levossa
- 2) Kohtalainen: lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä aina, muttei estä eläimen liikkumista
- 3) Vaikea: lateraalinen käyryys peräaukon edessä; TAI käyryys, joka estää liikkumisen; TAI käyryys, jonka suunta on dorsaaliseen ventraaliseen

Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (EPA) tieteellinen neuvoa-antava ryhmä FIFRA (FIFRA SAP 2013) arvioi yhteenvetotiedot skolioosista viidessätoista sammakkoeläinten muodonvaihdostestissä, joissa käytettiin *X. laevista* (NF-vaiheesta 51 vaiheeseen 60+) ja antoi yleisiä suosituksia tämän poikkeavuuden esiintyvyyden vähentämiseksi testipopulaatioissa. Nämä suositukset ovat merkityksellisiä myös LAGDA-testissä, vaikka tässä testissä tarkastellaankin pidempää kehityksellistä aikajanaa.

Aikaisempi kutemiskyky

Lisääntyvinä pareina tulee yleensä käyttää hyväkuntoisia ja terveitä aikuisia sammakoita. Sellaisten parien eliminointi, jotka tuottavat jälkeläisiä, joilla on skolioosi, voi minimoida sen ilmaantuvuuden ajan myötä. Etenkin luonnosta pyydystettyjen parien käytön minimoiminen voi olla tässä hyödyllistä. LAGDA-testissä altistus aika alkaa NF-vaiheessa 8–10 olevilla alkioilla, eikä testin alkaessa ole mahdollista määrittää, kehittykö tietyille

yksilöille skolioosi. Sen lisäksi, että testissä käytettäviltä eläimiltä seurataan skolioosin ilmaantumista, on dokumentoitava myös aikaisempi kyky tuottaa poikasia (myös skolioosin esiintyminen kaikilla toukilla, joiden annettiin kehittyä). Voi olla hyödyllistä jatkaa sellaisen poikueen osan tarkkailua, jota ei käytetä tietyssä tutkimuksessa, ja raportoida nämä havainnot (FIFRA SAP 2013).

Vedenlaatu

On tärkeää varmistaa, että veden laatu on riittävä sekä laboratoriokannassa että testin aikana. Niiden veden laatua koskevien kriteerien lisäksi, jotka arvioidaan rutiininomaisesti vesieliöiden toksisuustesteissä, voi olla hyödyllistä seurata mahdollisia ravintoainepuutoksia ja korjata ne tarvittaessa (esim. C-vitamiinin, kalsiumin ja fosforin puutos) tai liiallista seleeni- ja kuparipitoisuutta, sillä niiden on ilmoitettu aiheuttavan eriasteista skolioosia laboratorioissa kasvatetuille *Rana* sp. - ja *Xenopus* sp. -lajeille (Marshall ja muut 1980; Leibovitz ja muut. 1992; Martinez ja muut. 1992; FIFRA SAP:n raportin 2013 mukaisesti). Asianmukaisen ruokavalion (ks. lisäys 4) käyttö ja säännöllinen säiliön puhdistus yleensä parantavat vedenlaatua ja testiyksilöiden terveyttä.

Ruokavalio

LAGDA-testissä suotuisaa ruokavaliota koskevat erityissuositukset ovat lisäyksessä 4. Ravinnon lähteet on suositeltavaa tarkastaa sellaisten biologisten toksiinien, rikkakasvien torjunta-aineiden ja muiden kasvinsuojeluaineiden varalta, joiden tiedetään aiheuttavan skolioosia *X. laevis* tai muille vesieläimille (Schlenk ja Jenkins 2013). Esimerkiksi tietyille kolinesteraasin estäjille altistuminen on liitetty skolioosin esiintymiseen kaloilla (Schultz ja muut 1985) ja sammakoilla (Bacchetta ja muut 2008).

LÄHDEKIRJALLISUUS

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185–198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322–328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445–453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezii* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314–320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. ”