Denne tekst tjener udelukkende som dokumentationsværktøj og har ingen retsvirkning. EU's institutioner påtager sig intet ansvar for dens indhold. De autentiske udgaver af de relevante retsakter, inklusive deres betragtninger, er offentliggjort i den Europæiske Unions Tidende og kan findes i EUR-Lex. Disse officielle tekster er tilgængelige direkte via linkene i dette dokument

►B

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 440/2008

af 30. maj 2008

om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) Nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

(EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1)

Ændret ved:

		Tidende		
		nr.	side	dato
►M1	Kommissionens forordning (EF) nr. 761/2009 af 23. juli 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Kommissionens forordning (EU) nr. 1152/2010 af 8. december 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Kommissionens forordning (EU) nr. 640/2012 af 6. juli 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Kommissionens forordning (EU) nr. 260/2014 af 24. januar 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Kommissionens forordning (EU) nr. 900/2014 af 15. juli 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Kommissionens forordning (EU) 2016/266 af 7. december 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Kommissionens forordning (EU) 2017/735 af 14. februar 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Kommissionens forordning (EU) 2019/1390 af 31. juli 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 440/2008

af 30. maj 2008

om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) Nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

Artikel 1

De forsøgsmetoder, der skal anvendes i forbindelse med forordning (EF) nr. 1907/2006, er fastlagt i bilaget til nærværende forordning.

Artikel 2

Kommissionen revurderer efter behov forsøgsmetoderne i denne forordning med henblik på at erstatte, begrænse eller raffinere forsøg med hvirveldyr.

Artikel 3

Alle henvisninger til bilag V til direktiv 67/548/EØF skal betragtes som henvisninger til nærværende forordning.

Artikel 4

Denne forordning træder i kraft dagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Den anvendes fra den 1. juni 2008.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

▼B

BILAG

▼M6

Bemærk:

Inden brug af en af følgende testmetoder til at teste multikonstituent stoffer (MCS), stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) eller blandinger — og hvis dennes anvendelse til testning af MCS, UVCB eller blandinger ikke er angivet i den pågældende testmetode — bør det overvejes, om metoden er egnet til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.

Hvis testmetoden anvendes til at teste MCS, UVCB eller blandinger, skal der så vidt muligt foreligge tilstrækkelige oplysninger om sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og bestanddelenes relevante egenskaber.

▼B

DEL A: METODER TIL BESTEMMELSE AF FYSISK/KEMISKE EGENSKABER

INDHOLDSFORTEGNELSE

A.1. Smelte-/frysepunkt

A.2. Kogepunkt

A.3. Relativ massefylde

A.4. Damptryk

A.5. Overfladespænding

A.6. Vandopløselighed

A.8. Fordelingskoefficient

A.9. Flammepunkt

A.10. Antændelighed (faste stoffer)

A.11. Antændelighed (gasser)

A.12. Antændelighed (kontakt med vand)

A.13. Væskers og faste stoffers pyroforiske egenskaber

A.14. Eksplosive egenskaber

A.15. Selvantændelsestemperatur for væsker og gasser

A.16. Relativ selvantændelsestemperatur for faste stoffer

A.17. Oxiderende egenskaber (faste stoffer)

A.18. Polymerers antalsmiddelmolekylvægt og molekylvægtsfordeling

A.19. Polymerers indhold af lavmolekylære bestanddele

A.20. Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vand

A.21. Oxiderende egenskaber (væsker)

A.22. Fibres længdevægtede geometriske middeldiameter

A.23. Fordelingskoefficient (1-octanol/vand): slow-stirring-metoden

A.24. Fordelingskoefficient (n-octanol/vand), højtryksvæskekromatografi (hplc)-metoden

A.25. Dissociationskonstanter I vand (titreringsmetode — spektrofotometrisk metode — konduktometrisk metode)

▼B

A.1. SMELTE-/FRYSEPUNKT

1. METODE

De fleste af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uanset renheden.

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uanset renheden. Valg af metode afhænger af arten af det stof, der skal undersøges. Det er således afgørende, om stoffet let, vanskeligt eller slet ikke kan pulveriseres.

For nogle stoffer er bestemmelse af fryse- eller størkningspunkt mere hensigtsmæssigt, og der er i denne metode medtaget standarder for sådanne bestemmelser.

Hvis det som følge af stoffets særlige egenskaber er umuligt at bestemme nogen af ovenstående parametre, kan det være hensigtsmæssigt at bestemme et flydepunkt.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Smeltepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken faseovergangen fra fast til flydende tilstand finder sted ved atmosfæretryk, og denne temperatur svarer i det ideale tilfælde til temperaturen ved frysepunktet.

Da faseovergangen for mange stoffer finder sted over et temperaturinterval, beskrives den ofte som smeltepunktsintervallet.

Enhedsomregning (K til ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: er temperaturen i grader celsius (^{o}C)

T: er temperaturen i kelvin (K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest bruges til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i henvisningerne (4) angivet nogle referencestoffer.

▼B

1.4. METODENS PRINCIP

Temperaturen (temperaturintervallet) for faseovergangen fra fast til flydende tilstand eller fra flydende til fast tilstand bestemmes. I praksis bestemmes temperaturen ved begyndende smeltning/frysning og ved endelig smeltning/frysning under opvarmning/afkøling af en prøve af stoffet ved atmosfæretryk. Der er beskrevet fem typer metoder: kapillarmetoder, varmebordsmetoder, frysepunktsbestemmelser, termoanalyse og flydepunktsbestemmelse (som udviklet til mineralolier).

Det kan i nogle tilfælde være mere hensigtsmæssigt at bestemme frysepunktet end smeltepunktet.

1.4.1. **Kapillarmetode**

1.4.1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

En lille mængde af det findelte stof fyldes i et kapillarrør og pakkes tæt. Røret opvarmes sammen med et termometer, og temperaturstigningen indstilles til mindre end ca. 1 K/min under den egentlige smeltning. Temperaturen ved begyndende og endelig smeltning bestemmes.

1.4.1.2. *Smeltepunktsapparater med metalblok*

Som beskrevet under 1.4.1.1 bortset fra, at kapillarrøret og termometeret er anbragt i en opvarmet metalblok og kan iagttages gennem huller i blokken.

1.4.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

Prøven i kapillarrøret opvarmes automatisk i en metalcylinder. En lysstråle sendes via et hul i cylinderen gennem stoffet og ind på en nøjagtigt indstillet fotocelle. De fleste stoffers optiske egenskaber ændres under smeltning fra at være uigennemsigtige til gennemsigtige. Derved øges den lysmængde, som når frem til fotocellen, og der sendes et stopsignal til en digitalindikator, som viser temperaturen af et platinmodstandstermometer anbragt i varmekammeret. Denne metode kan ikke anvendes for visse stærkt farvede stoffer.

1.4.2. **Varmeborde**

1.4.2.1. *Koflers varmebænk*

Koflers varmebænk består af to elektrisk opvarmede metalstykker med forskellig varmeledningsevne og er udformet sådan, at dens temperaturgradient i længderetningen er næsten lineær. Varmebænken kan spænde over temperaturområdet fra 283 K til 573 K og er forsynet med en særlig anordning til temperaturaflæsning, som består af en skyder med en viser, og en fane, og som er særligt udformet til den enkelte bænk. Smeltepunktet bestemmes ved, at det pågældende stof lægges i et tyndt lag direkte på bænkens overflade, hvorefter der på få sekunder opstår en skarp skillelinje mellem flydende og fast fase. Temperaturen på skillelinjen aflæses ved at indstille viseren på denne.

▼B

1.4.2.2. *Smeltemikroskop*

Der anvendes en række varmeborde med mikroskop til smeltepunktsbestemmelser på meget små stofmængder. I de fleste varmeborde måles temperaturen med et følsomt termoelement, men undertiden anvendes også kviksølvtermometre. Et typisk smeltepunktsapparat, bestående af varmebord med mikroskop, er udstyret med et varmekammer indeholdende en metalplade, hvorpå prøven anbringes i en slæde. I midten af metalpladen er der et hul, hvorigennem der kan sendes lys fra mikroskopets belysningsspejl. Når apparatet er i brug, er kammeret lukket med en glasplade for at forhindre luftens adgang til prøven.

Opvarmningen af prøven reguleres med en rheostat. Kræves meget nøjagtige målinger kan der for optisk anisotrope stoffer anvendes polariseret lys.

1.4.2.3. *Meniskmetoden*

Denne metode anvendes kun for polyamider.

Den temperatur, ved hvilken forskydningen af en silikonoliemenisk, som er indesluttet mellem et varmebord og et dækglas hvilende på polyamid-prøveemnet, iagttages visuelt.

1.4.3. **Metode til bestemmelse af frysepunkt**

Prøven anbringes i en særlig type reagensglas og anbringes i et apparat til bestemmelse af frysepunkt. Prøven afkøles under stadig langsom omrøring, og temperaturen måles med passende mellemrum. Når temperaturen er konstant ved flere aflæsninger, anføres denne temperatur (korrigeret for termometerfejl) som frysepunktet.

Underafkøling skal undgås ved, at der opretholdes ligevægt mellem den faste fase og væskefasen.

1.4.4. **Termoanalyse**

1.4.4.1. *Differential termoanalyse (DTA)*

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

▼B

1.4.4.2. *Differential scanning kalorimetri (DSC)*

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

1.4.5. **Flydepunkt**

Denne metode er udviklet til mineralolier og er egnet til olieagtige stoffer med lavt smeltepunkt.

Efter først at være opvarmet afkøles prøven med en bestemt hastighed, og dens flydeegenskaber undersøges med 3 K's mellemrum. Den laveste temperatur, ved hvilken der kan iagttages bevægelse i stoffet, registreres som flydepunktet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af smeltepunkt/smeltepunktsinterval er angivet i følgende tabel:

TABEL: METODERNES ANVENDELIGHED

A. **Kapillarmetoder**

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperaturområde	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Smeltepunkts-apparater med væskebad	ja	enkelte	273 til 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smeltepunkts-apparater med metalblok	ja	enkelte	293 til > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Bestemmelse med fotocelle	ja	adskillige ved hjælp af særligt udsryr	253 til 573 K	± 0,5 K	

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

▼B

B. **Varmeborde og frysemetoder**

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperaturområde	Skønnet (1) nøjagtigned	Foreliggende standard
Koflers varmebænk	ja	nej	283 K til > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Smekemikroskop	ja	enkelte	273 K til > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskmetode	nej	kun for polyamider	293 K til > 573 K	± 0,5 K	IS0 1218 (E)
Frysepunktsmetoder	ja	ja	223 K til 573 K	± 0,5 K	f.eks. BS 4695

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

C. **Termoanalyse**

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperaturområde	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Differential termoanalyse	ja	ja	173 K til 1 273 K	op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differential scanning kalorimetri	ja	ja	173 K til 1 273 K	op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Afhxngig af instrumenttype og stoffets renhed.

D. **Flydepunkt**

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperaturområde	Skønnet (1) nø-jagtighcd	Foreliggende standard
Flydepunkt	for mineralolier og olieagtige stoffer	for mineralolier og olieagtige stoffer	223 K til 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

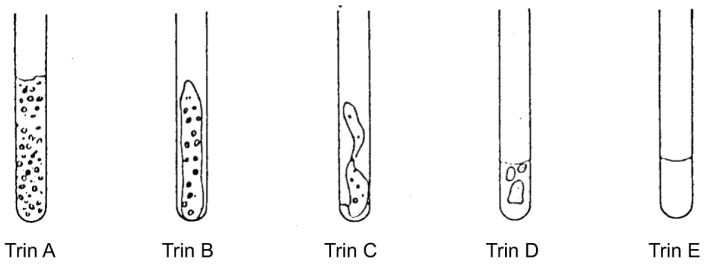
Fremgangsmåden er for næsten alle undersøgelsesmetoderne beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillægget).

1.6.1. **Kapillarrørsmetoder**

Fint pulveriserede stoffer udviser ved langsom opvarmning sædvanligvis et smeltningsforløb som vist på figur 1.

▼B

Figur 1



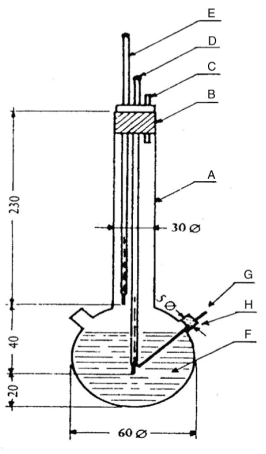
Trin A	(begyndende smeltning): Små dråber fordeler sig jævnt over kapillarrørets indervæg.
Trin B	Der opstår et mellemrum mellem prøven og indervæggen som følge af prøvens skrumpning under smeltningen.
Trin C	Den indskrumpne prøve begynder at synke ned på bunden og blive flydende.
Trin D	Der dannes en ubrudt væskeoverflade, men en væsentlig del af prøven består stadig af fast stof.
Trin E	(endelig smeltning): Der er ingen faste partikler.

Under smeltepunktsbestemmelsen noteres temperaturerne ved begyndende og endelig smeltning.

1.6.1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

Figur 2 viser en type standardiseret smeltepunktsapparat (JIS K 0064). Apparatet er fremstillet af glas, og alle mål er angivet i mm.

Figur 2



A: Målebeholder
B: Prop
C: Udluftningshul
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Kapillarrør af glas; længde 80-100 mm; indre diameter 1,0 ± 0,2 mm; vægtykkelse 0,2-0,3 mm
H: Siderør

▼B

Badvæske:

Der vælges en passende væske. Valget afhænger af, hvor højt et smeltepunkt der skal bestemmes, f.eks. paraffinolie for smeltepunkter op til 473 K og silikonolie for smeltepunkter op til 573 K.

For smeltepunkter over 523 K kan der anvendes en blanding af 3 dele svovlsyre og 2 dele kaliumsulfat (masseforhold). Anvendes denne blanding, skal der træffes passende sikkerhedsforholdsregler.

Termometer:

Man bør kun anvende termometre, som opfylder kravene i de følgende eller tilsvarende standarder:

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

Fremgangsmåde:

Det tørre stof pulveriseres fint i en morter og fyldes i kapillarrøret, som er lukket i den ene ende, således at fyldningshøjden er ca. 3 mm efter tæt pakning. For at opnå en ensartet pakket prøve lader man kapillarrøret falde fra en højde af ca. 700 mm gennem et lodret glasrør ned på et urglas.

Det fyldte kapillarrør anbringes i badet, således at den midterste del af termometerets kviksølvbeholder berører den del af kapillarrøret, som prøven befinder sig i. Sædvanligvis anbringes kapillarrøret i apparatet, når badets temperatur er ca. 10 K under smeltepunktet.

Badvæsken opvarmes med en temperaturstigning på ca. 3 K/min under omrøring af væsken. Når temperaturen er ca. 10 K under det forventede smeltepunkt, indstilles temperaturstigningen til højst 1 K/min.

Beregning:

Smeltepunktet beregnes således:

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

hvor:

T = korrigeret smeltepunktstemperatur i K

T_D = temperaturaflæsning af termometer D i K

T_E = temperaturaflæsning af termometer E i K

n = antallet af gradinddelinger på den udestående del af termometer D's kviksøjle.

1.6.1.2. *Smeltepunktapparatar med metalblok*

Apparat:

Dette består af:

— en cylindrisk metalblok, hvis øverste del er hul og danner et kammer (se figur 3)

— en metalprop med to eller flere huller, som muliggør anbringelse af rør i metalklodsen

▼B

— et opvarmningssystem for metalklodsen, f.eks. i form af en elektrisk modstand indbygget i blokken

— en rheostat til regulering af energitilførslen, hvis der anvendes elektrisk opvarmning

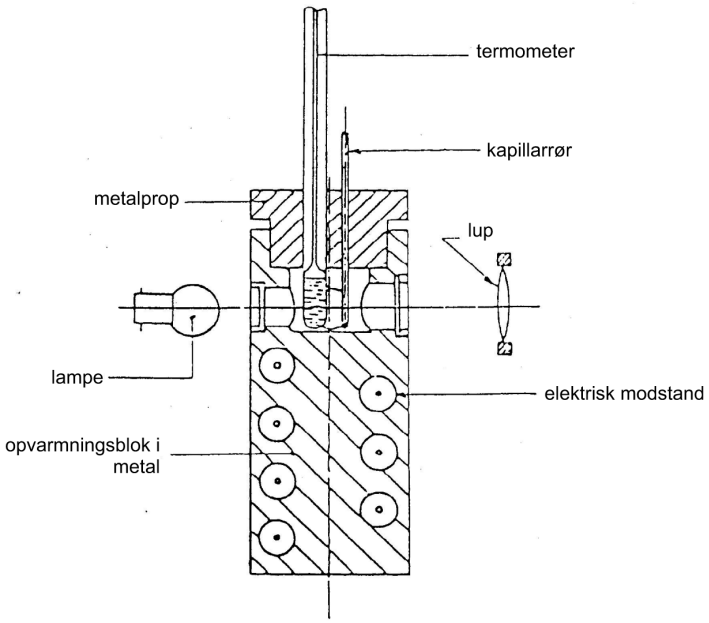
— fire vinduer af varmeresistent glas i kammerets sidevægge, anbragt diametralt og vinkelret på hinanden. Foran et af disse vinduer er der anbragt en lup til iagttagelse af kapillarrøret. De tre andre vinduer tjener til belysning af indersiden af kammeret ved hjælp af lamper

— et kapillarrør af varmeresistent glas lukket i den ene ende (se 1.6.1.1).

Termometer:

Se standarderne i 1.6.1.1. Termoelektriske måleinstrumenter med tilsvarende nøjagtighed kan også anvendes.

Figur 3



1.6.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

Apparat og fremgangsmåde:

Apparatet består af et metalkammer med et automatisk opvarmningssystem. Tre kapillarrør fyldes som i 1.6.1.1 og anbringes i ovnen.

▼B

Der er mulighed for flere lineære temperaturstigninger til kalibrering af apparatet, og temperaturstigningen indstilles elektrisk til en passende forudvalgt konstant og lineær hastighed. Skrivere viser den øjeblikkelige ovntemperatur og temperaturen af stoffet i kapillarrørene.

1.6.2. **Varmeborde**

1.6.2.1. *Koflers varmebænk*

Se tillæg.

1.6.2.2. *Smeltemikroskop*

Se tillæg.

1.6.2.3. *Meniskmetode (polyamider)*

Se tillæg.

Opvarmingshastigheden ved smeltepunktet skal være mindre end 1 K/min.

1.6.3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

Se tillæg.

1.6.4. **Termoanalyse**

1.6.4.1. *Differential termoanalyse*

Se tillæg.

1.6.4.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg.

1.6.5. **Bestemmelse af flydepunkt**

Se tillæg.

2. **DATA**

I visse tilfælde er termometerkorrektion nødvendig.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuelt indledende oprensningstrin

— den skønnede nøjagtighed.

Som smeltepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabellerne).

▼B

Hvis forskellen mellem temperaturen ved begyndende og endelig smeltning ligger inden for metodens nøjagtighed, angives temperaturen ved den endelige smeltning som smeltepunktet; i modsat fald angives begge temperaturer.

Hvis stoffet dekomponerer eller sublimerer, inden smeltepunktet er nået, anføres den temperatur, hvor dette fænomen er iagttaget.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. **HENVISNINGER**

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

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

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

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder.

1. **Kapillarmetoder**

1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad

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

1.2. Smeltepunktsapparater med metalblok

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

2. **Varmeborde**

2.1. Koflers varmebænk

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

2.2. Smeltemikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Meniskmetode (polyamider)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of »melting point«

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du »point de fusion« methode du menisque

3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de Congelation
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termoanalyse**

4.1. Differential termoanalyse

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

▼B

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

4.2. Differential scanning kalorimetri

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

5. **Bestemmelse af flydepunkt**

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

▼B

A.2. KOGEPUNKT

1. METODE

Flertallet af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

De her beskrevne metoder kan anvendes for alle væsker og lavtsmeltende stoffer, forudsat at der ikke indtræder nogen kemisk reaktion under kogepunktet (f.eks. autooxidation, omlejring eller nedbrydning). Metoderne kan anvendes for alle væsker uanset renheden.

De metoder, hvor der benyttes bestemmelse med fotocelle, og de, der er baseret på termoanalyse, fremhæves specielt, da de kan benyttes til bestemmelse af både smelte- og kogepunkt. Desuden kan disse målinger udføres automatisk.

Den dynamiske metode har den fordel, at den også kan benyttes til bestemmelse af damptryk, og det er ikke nødvendigt at korrigere kogepunktstemperaturen til standardtryk (101,325 kPa), da standardtrykket kan indstilles med en pressostat under målingen.

Bemærkninger:

Urenheders indflydelse på kogepunktsbestemmelsen afhænger stærkt af deres art. Hvis der i prøven er flygtige urenheder, som vil kunne få indflydelse på resultaterne, kan stoffet eventuelt renses.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Standardkogepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken en væskes damptryk er 101,325 kPa.

Måles kogepunktet ikke ved standardatmosfæretryk, kan damptrykkets afhængighed af temperaturen beskrives ved Clausius-Clapeyrons ligning:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3\ RT} + \text{konstant}$$

hvor:

P = stoffets damptryk i pascal

ΔH_v = stoffets fordampningsvarme i J mol^{-1}

R = gaskonstanten = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = den absolutte temperatur i K

Kogepunktet opgives i forhold til det aktuelle tryk under målingen.

▼B

Omregninger

Tryk (enhed kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(»bar« er stadig tilladt, men anbefales ikke)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(enhederne »mm Hg« og »Torr« er ikke tilladt).

1 atm = standardatmosfære = 101 325 Pa

(»atm«-enheden er ikke tilladt).

Temperatur (enhed: K)

$t = T - 273{,}15$

t: er temperaturen i grader celsius (^{o}C)

T: er termodynamisk temperaturen i kelvin (K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i de metoder, der er anført i tillægget, angivet nogle referencestoffer.

1.4. METODENS PRINCIP

Der er fem metoder til bestemmelse af kogepunkt (kogepunktsinterval), som er baseret på måling af den temperatur, ved hvilken prøven koger, og to metoder baseret på termoanalyse.

1.4.1. **Bestemmelse ved hjælp af ebulliometer**

Ebullitometre blev oprindeligt udviklet til molekylvægtsbestemmelse via kogepunktsforhøjelse, men de er også velegnede til nøjagtige kogepunktsbestemmelser. Et meget enkelt apparat er beskrevet i ASTM D 1120-72 (se tillæg). I dette apparat opvarmes væsken under ligevægtsbetingelser ved atmosfæretryk, indtil den koger.

1.4.2. **Dynamisk metode**

Ved denne metode måles dampens fortætningstemperatur ved hjælp af et egnet termometer anbragt i tilbagesvaleren under kogning. Trykket kan varieres ved denne metode.

1.4.3. **Destillationsmetode til bestemmelse af kogepunkt**

Ved denne metode destilleres væsken, og dampens fortætningstemperatur samt destillatmængden måles.

▼B

1.4.4. **Siwoloboffs metode**

En prøve opvarmes i et prøverør, som er nedsænket i et varmebad. Et tilsmeltet kapillarrør med en luftboble i den nederste ende er nedsænket i prøverøret.

1.4.5. **Bestemmelse med fotocelle**

Der foretages automatisk fotoelektrisk måling af opstigende bobler under anvendelse af Siwoloboffs princip.

1.4.6. **Differential termoanalyse**

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.4.7. **Differential scanning kalorimetri**

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af kogepunkt/kogepunktsinterval er angivet i tabel 1.

Tabel 1

Sammenligning af metoderne

Målemetode	Skønnet nøjagtighed	Foreliggende standard
Ebulliometer	± 1,4 K (op ril 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (op til 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamisk metode	± 0,5 K (op til 600 K) (2)	
Destillationsforløb (kogepunktsinterval)	± 0,5 K (op til 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff's metode	± 2 K (op til 600 K) (2)	
Bestemmelse med fotocelle	± 0,3 K (ved 373 K) (2)	
Differential termoanalyse	± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differential scanning kalorimetri	± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Denne nøjagtighed gælder kun for det simple apparat, som er beskrevet i f.eks. ASTM D 1120-72, den kan forbedres med mere raffinerede ebulliometre.
(2) Gælder kun for rene stoffer. Anvendelse under andre betingelser skal begrundes.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Nogle af metodernes fremgangsmåder er beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillæg).

1.6.1. **Ebulliometer**

Se tillæg.

1.6.2. **Dynamisk metode**

Se metode A.4 til bestemmelse af damptryk.

Den kogetemperatur, der iagttages ved et tryk på 101,325 kPa, noteres.

1.6.3. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

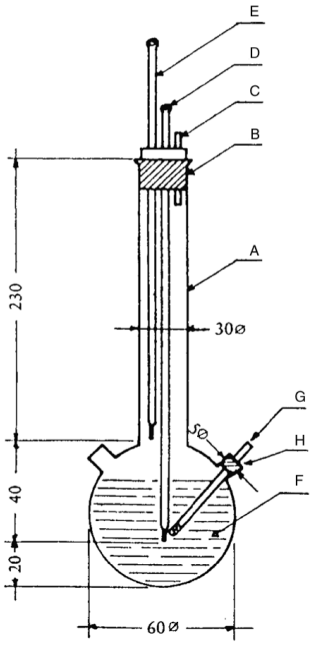
Se tillæg.

1.6.4. **Siwoloboffs metode**

Prøven opvarmes i et smeltepunktsapparat i et prøverør med en diameter på ca. 5 mm (figur 1).

Figur 1 viser en model af et standardiseret smelte- og kogepunktsapparat (JIS K 0064) (fremstillet af glas, alle mål i millimeter).

Figur 1



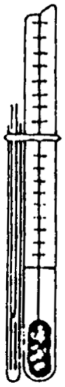
A: Målebeholder
B: Prop
C: Udluftning
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Prøverør, ydre diameter maks. 5 mm, med ca. 100 mm langt kapillarrør med indre diameter maks. 1 mm og vægtykkelse ca. 0,2-0,3 mm
H: Siderør

Et kapillarrør, som er tilsmeltet ca. 1 cm over den nederste ende, anbringes i prøverøret. Der fyldes så meget prøve i, at den tilsmeltede del af kapillarrøret befinder sig under væskeoverfladen. Prøverøret med kapillarrøret fastgøres til termometeret med en elastik eller fastholdes støttet fra siden (se figur 2).

▼B

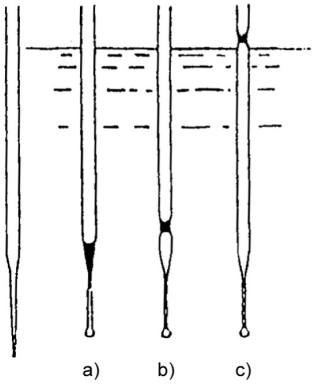
Figur 2

Siwoloboff's princip



Figur 3

Modificeret princip



Badvæsken vælges under hensyntagen til kogepunktet. Ved en temperatur på op til 573 K kan der benyttes silikonolie. Flydende paraffin må kun anvendes op til 473 K. Badvæsken opvarmes først med en hastighed på 3 K pr. minut under omrøring. Ca. 10 K under det forventede kogepunkt sænkes varmetilførslen, så temperaturstigningen bliver mindre end 1 K pr. minut. Når temperaturen nærmer sig kogepunktet, begynder der at strømme bobler ud af kapillarrøret.

Kogepunktet er den temperatur, hvor boblestrømmen under et kortvarigt temperaturfald standser og væsken begynder at stige op i kapillarrøret. Termometeraflæsningen viser stoffets kogepunkt.

I det modificerede princip (figur 3) bestemmes kogepunktet i et smeltepunktskapillarrør. Det trækkes ud til en ca. 2 cm lang tynd spids (a), og en smule af prøven suges op heri. Den åbne ende af det tynde kapillarrør tilsmeltes, så der dannes en lille luftboble ved enden. Ved opvarmning i smeltepunktsapparatet (b) udvider luftboblen sig. Kogepunktet ligger ved den temperatur, hvor stofproppen når op i højde med badvæskens overflade (c).

1.6.5. **Bestemmelse med fotocelle**

Prøven opvarmes i et kapillarrør i en opvarmet metalblok.

Via passende huller i blokken sendes der en lysstråle gennem stoffet ind til en nøjagtigt kalibreret fotocelle.

Medens temperaturen i prøven stiger, undviger der enkelte bobler fra kapillarrøret. Når kogepunktet er nået, vokser antallet af bobler voldsomt. Herved ændres intensiteten af det lys, som fotocellen modtager, så der sendes et stopsignal til den indikator, der viser temperaturen af et platinmodstandstermometer, der er anbragt i blokken

Denne metode er særlig anvendelig, da den kan benyttes til bestemmelser under stuetemperatur ned til 253,15 K (– 20 °C) uden ændringer ved apparaturet. Instrumentet skal blot anbringes i et kuldebad.

▼B

1.6.6. **Termoanalyse**

1.6.6.1. *Differential termoanalyse*

Se tillæg.

1.6.6.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg.

2. **DATA**

Ved små afvigelser fra standardtryk (maks. ± 5 kPa) korrigeres kogepunktstemperaturerne ved hjælp af Sidney-Youngs ligning:

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

hvor

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [bemærk fortegnet]

p = trykket målt i kPa

f_T = kopepunktets ændring med trykker i K/kPa

T = målt kogepunkt i K

T_n = kogepunkt i K, korrigeret til standardtryk

I ovennævnte nationale og internationale standarder findes der temperaturkorrektionsfaktorer f_T for mange stoffer og udtryk til tilnærmelse af dem.

Eksempelvis anføres i DIN 53171 følgende grove korrektioner for opløsningsmidler i maling:

Tabel 2

Temperaturkorrektionsfaktorer f_T

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

▼B

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuel indledende rensning

— den skønnede nøjagtighed.

Som kogepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabel 1).

De målte kogetemperaturer og gennemsnittet heraf skal anføres, og det tryk, hvorved målingerne er foretaget, opgives i kPa. Trykket skal helst ligge nær standardatmosfæretryk.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. **HENVISNINGER**

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

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

(3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder

1. **Ebulliometer**

1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad

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

2. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

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

3. **Differential termoanalyse og differential scanning kalorimetri**

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

▼B

A.3. RELATIV MASSEFYLDE

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder til bestemmelse af relativ massefylde kan anvendes for faste stoffer og væsker uanset renheden. De forskellige metoder, som kan anvendes, er anført i tabel 1.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den relative massefylde, D_4^{20}, af faste stoffer og væsker er forholdet mellem massen af et rumfang af det undersøgte stof bestemt ved 20 °C og massen af det samme rumfang vand bestemt ved 4 °C. Den relative massefylde er dimensionsløs.

Massefylden, P, af et stof er dets masse m divideret med dets rumfang v.

Massefylden, P, opgives i kg/m^3 (SI-enheder).

1.3. REFERENCESTOFFER (1) (3)

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODERNES PRINCIP

Der benyttes fire typer metoder.

1.4.1. **Opdriftsmetoder**

1.4.1.1. *Aræometer* (for væsker)

Der kan opnås tilstrækkelig nøjagtige og hurtige massefyldebestemmelser med araæometre, hvor massefylden af en væske udledes af flydehøjden ved aflæsning på en skala.

1.4.1.2. *Hydrostatisk vægt* (for væsker og faste stoffer)

Forskellen mellem massen af en prøve i henholdsvis atmosfærisk luft og en passende væske (f.eks. vand) kan anvendes til at bestemme dens massefylde.

For faste stoffer er den fundne massefylde kun repræsentativ for den bestemte prøve, som er anvendt til bestemmelsen. Til bestemmelse af væskers massefylde vejes et legeme med kendt rumfang v først i atmosfærisk luft og dernæst i væsken.

1.4.1.3. *Metode med nedsænket legeme* (for væsker) (4)

Ved denne metode bestemmes en væskes massefylde ud fra forskellen mellem resultaterne af vejning af væsken før og efter nedsænkning af et legeme med kendt rumfang her.

▼B

1.4.2. **Pyknometermetoder**

Pyknometre af forskellig udformning og med kendt rumfang kan anvendes for faste stoffer og væsker. Massefylden beregnes ud fra masseforskellen mellem det fulde og det tomme pyknometer og dets kendte rumfang.

1.4.3. **Luftsammenligningspyknometer** (for faste stoffer)

Massefylden af et fast stof i enhver form kan bestemmes ved stuetemperatur med et gassammenligningspyknometer. Rumfanget af en prøve af stoffet måles i atmosfærisk luft eller i en inaktiv luftart i en beholder med korrigeret rumfangsinddeling. Til beregning af massefylden foretages efter rumfangsbestemmelsen en bestemmelse af prøvens masse.

1.4.4. **Oscillerende densitometer** (5) (6) (7)

Massefylden af en væske kan bestemmes med et oscillerende densitometer. En mekanisk oscillator i form af et U-rør sættes i svingning ved sin resonansfrekvens, der afhænger af dens masse. Når der indføres en prøve heri, ændres oscillatorens resonansfrekvens. Apparatet kalibreres med to væsker med kendt massefylde. Disse stoffer vælges fortrinsvis således, at deres massefylde ligger i hver sin ende af det pågældende måleområde.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendeligheden af de forskellige metoder, der anvendes til bestemmelse af den relative massefylde, er opstillet i tabellen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Tillægget indeholder en liste over nogle standarder, hvorfra yderligere tekniske detaljer kan hentes.

Målingerne skal udføres ved 20 °C, og der foretages mindst to bestemmelser.

2. **DATA**

Se standarderne.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (art og urenheder) og eventuel indledende rensning.

Den under 1.2 definerede relative massefylde D_4^{20} rapporteres tillige med det undersøgte stofs fysiske tilstand.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand, skal anføres.

▼B

Tabel

Metodernes anvendelighed

Målemetode	Massefylde		Maksimal dynamisk viskositet	Foreliggende standarder
	fast stof	væske		
1.4.1.1. Aræometer		ja	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatik vægt				
a) faste stoffer	ja			ISO 1183 (A)
b) væsker		ja	5 Pa S	ISO 901 og 758
1.4.1.3. Metode med nedsænket legeme		ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) faste stoffer	ja			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) væsker		ja	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Luftssammenligningspyknometer	ja			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscillerende densitometer		ja	5 Pa s	

4. **HENVISNINGER**

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

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

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

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.II, 427-430.

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

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

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder:

1. **Opdriftsmetoder**

1.1. Aræometer

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

1.2. Hydrostatisk vægt

For faste stoffer

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

For væsker

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3. Metode med nedsænket legeme

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

2. **Pyknometermetoder**

2.1. For væsker

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

▼B

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

▼B

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

▼M1

A.4. **DAMPTRYK**

1. **METODE**

Metoden er ækvivalent med OECD TG 104 (2004).

1.1. INDLEDNING

Denne reviderede version af metode A.4 (1) omfatter én supplerende metode, effusionsmetoden: isoterm termogravimetri, som er udviklet til stoffer med meget lavt tryk (ned til 10^{-10} Pa). Da der er et særligt behov for metoder til måling af damptrykket af stoffer med lavt damptryk, er de øvrige procedurer i denne metode revurderet med hensyn til andre anvendelsesområder.

Ved termodynamisk ligevægt er damptrykket af et rent stof alene en funktion af temperaturen. Grundprincipperne findes beskrevet andetsteds (2)(3).

Ingen enkelt måleteknik kan anvendes på hele trykområdet fra mindre end 10^{-10} til 10^5 Pa. I denne metode til damptrykmåling indgår otte metoder, som kan anvendes i forskellige damptrykintervaller. I tabel 1 sammenlignes de forskellige metoders anvendelighed og måleområde. Metoderne kan kun bruges på forbindelser, der ikke dekomponeres under de pågældende testbetingelser. I tilfælde, hvor de eksperimentelle metoder af tekniske grunde ikke kan anvendes, kan et tilnærmet damptryk beregnes, og i tillægget beskrives en anbefalet beregningsmetode.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Ved damptrykket af et stof forstås mætningstrykket over stoffet i fast eller flydende tilstand.

Som trykenhed bør anvendes SI-enheden, der er pascal (Pa). Nedenfor er angivet andre, tidligere anvendte enheder og de tilhørende omregningsfaktorer:

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

1 atmosfære = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

SI-enheden for temperatur er kelvin (K). Omregning af grader celsius til kelvin sker med formlen:

$T = t + 273{,}15$

hvor T er kelvin-temperaturen eller den termodynamiske temperatur, og t er temperaturen i grader celsius.

▼**M1**

Tabel 1

Målemetode	Stof		Anslået repeterbarhed	Anslået Reproducerbarhed	Anbefalet område
	Faststof	Væske			
Den dynamiske metode	Letsmelteligt	Ja	indtil 25 % 1 til 5 %	indtil 25 % 1 til 5 %	10^3 Pa til 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa til 10^5 Pa
Den statiske metode	Ja	Ja	5 til 10 %	5 til 10 %	10 Pa til 10^5 Pa 10^{-2} Pa til 10^5 Pa (1)
Isoteniskop-metoden	Ja	Ja	5 til 10 %	5 til 10 %	10^2 Pa til 10^5 Pa
Effusionsmetoden: damptrykbalance	Ja	Ja	5 til 20 %	indtil 50 %	10^{-3} til 1 Pa
Effusionsmetoden: Knudsen-celle	Ja	Ja	10 til 30 %	—	10^{-10} til 1 P
Effusionsmetoden: isotermisk termogravimetri	Ja	Ja	5 til 30 %	indtil 50 %	10^{-10} til 1 Pa
Gasmætnings-metoden	Ja	Ja	10 til 30 %	indtil 50 %	10^{-10} til 10^3 Pa
Metoden med roterende kugle	Ja	Ja	10 til 20 %	—	10^{-4} til 0,5 Pa

(1) Ved brug af kapacitansmanometer.

1.3. TESTENS PRINCIP

Sædvanligvis bestemmes damptrykket ved forskellige temperaturer. Inden for et begrænset temperaturområde er logaritmen til damptrykket af et rent stof en lineær funktion af den reciprokke termodynamiske temperatur ifølge den forenklede Clausius-Clapeyron-ligning:

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

hvor:

p = damptrykket i pascal

ΔHv = fordampningsvarmen i J mol^{-1}

R = den universelle gaskonstant, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperaturen i K

▼M1

1.4. REFERENCESTOFFER

Referencestoffer behøver ikke anvendes. De bruges hovedsagelig til lejlighedsvis kontrol af en metodes præstationer og til at sammenligne resultaterne fra forskellige metoder.

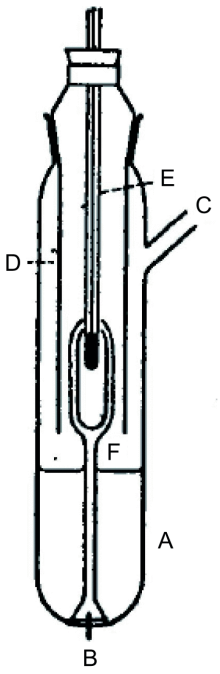
1.5. BESKRIVELSE AF METODEN

1.5.1. **Den dynamiske metode (Cottrells metode)**

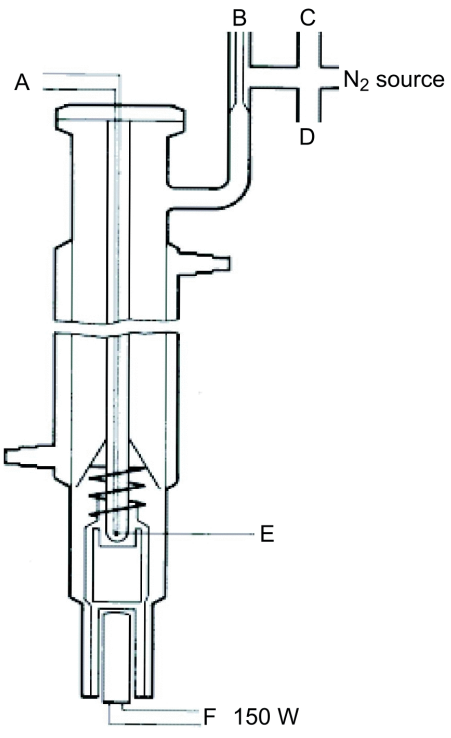
1.5.1.1. *Princip*

Damptrykket bestemmes ved måling af stoffets kogepunktstemperatur ved forskellige givne tryk mellem ca. 10^3 og 10^5 Pa. Metoden anbefales også til kogepunktsbestemmelse. Til det formål er metoden brugbar op til 600 K. Væskers kogepunktstemperatur er ca. 0,1 °C højere i en dybde af 3-4 cm end ved overfladen på grund af det hydrostatiske tryk fra væskesøjlen. I Cottrells metode (4) er termometeret placeret i dampen over væskeoverfladen, og den kogende væske bringes til konstant at pumpe sig selv ud over termometerets kugle. Kuglen er dækket af et tyndt lag væske, der er i ligevægt med dampen ved atmosfæretryk. Termometeret viser derfor det sande kogepunkt uden fejl pga. overhedning eller hydrostatisk tryk. Den oprindelige pumpe, som Cottrell anvendte, ses i figur 1. Rør A indeholder den kogende væske. En indlejret platintråd B i bunden gør kogningen mere ensartet. Siderøret C fører til en kondensator, og kappen D forhindrer det kolde kondensat i at nå termometeret E. Når væsken i A koger, bliver bobler og væske opfanget af tragten og via de to arme af pumpen F ledt ud over termometerets kugle.

Figur 1



Figur 2



▼**M1**

Cottrell-pumpe (4)

A: Termoelement

B: Vakuum-stødpudevolumen

C: Trykmåler

D: Vakuum

E: Målepunkt

F: Varmeelement, ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparatur*

I figur 2 er vist et meget nøjagtigt apparat, der arbejder efter Cottrells princip. Det består af et rør med en kogesektion i underdelen, en svaler i midten og en afgang med flange i overdelen. Cottrell-pumpen er anbragt i kogesektionen, der opvarmes af en elektrisk varmepatron. Temperaturen måles af et termoelement med kappe eller af et modstandstermometer, der er ført gennem flangen foroven. Afgangen er tilsluttet trykreguleringssystemet. Dette består af en vakuumpumpe, et stødpudevolumen, en trykregulator for tilførsel af nitrogen til trykregulering og et manometer.

1.5.1.3. *Fremgangsmåde*

Stoffet anbringes i kogesektionen. Faste stoffer, der ikke er pulverformige, kan volde problemer, som dog undertiden kan løses ved opvarmning af kølekappen. Apparatet forsegles ved flangen, og stoffet afgasses. Skumdannende stoffer kan ikke måles med denne metode.

Derefter sættes det laveste ønskede tryk, og der tændes for opvarmningen. Samtidig tilsluttes temperaturføleren til en skriver.

Ligevægt er nået, når der registreres konstant kogetemperatur ved konstant tryk. Særlig omhu må udvises for at undgå stødkogning. Desuden skal kondensationen i svaleren være fuldstændig. Ved damptryksbestemmelse for letsmeltelige faste stoffer skal man passe på, at svaleren ikke bliver tilstoppet.

Efter at dette ligevægtspunkt er nået, sættes et højere tryk. Processen fortsættes på denne måde, indtil 10^5 Pa er nået (i alt 5 til 10 målepunkter). Som kontrol gentages ligevægtspunkterne ved faldende værdier af trykket.

1.5.2. **Den statiske metode**

1.5.2.1. *Princip*

Ved den statiske metode (5) bestemmes damptrykket i termodynamisk ligevægt ved en fastlagt temperatur. Metoden er velegnet til enkeltstoffer samt væsker og faste stoffer bestående af flere komponenter i området fra 10^{-1} til 10^5 Pa samt, med tilstrækkelig omhu, i området 1 til 10 Pa.

▼**M1**

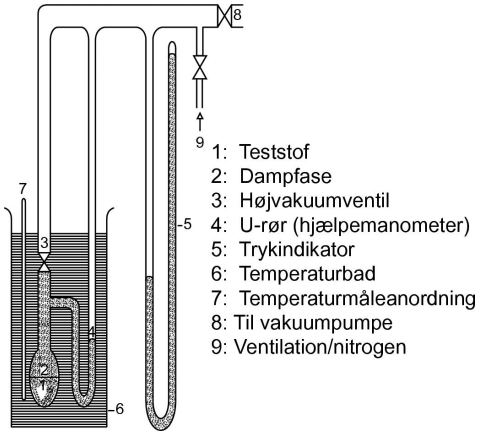
1.5.2.2. *Apparatur*

Apparatet består af et termostatbad (præcision ± 0,2 K), en prøvebeholder tilsluttet en vakuumledning, et manometer og et system til trykregulering. Prøvekammeret (figur 3a) er tilsluttet vakuumledningen gennem en ventil og et differensmanometer (et U-rør indeholdende en egnet manometervæske), der fungerer som nulindikator. I differensmanometeret kan anvendes kviksølv, siliconeolie og phthalater, afhængigt af trykområdet og teststoffets kemiske egenskaber. Kviksølv bør dog om muligt undgås af hensyn til miljøet. Teststoffet må ikke være nævneværdigt opløseligt i væsken i U-røret eller kunne reagere med denne. I stedet for U-røret kan anvendes en trykmåler (figur 3b). I manometeret kan kviksølv anvendes i området fra normalt tryk ned til 10^2 Pa, mens siliconeolier og phthalater er egnede ved tryk under 10^2 Pa ned til 10 Pa. Der findes andre trykmålere, som kan anvendes ved tryk under 10^2 Pa, og opvarmede membrankapacitetsmanometre kan endda bruges ved tryk under 10^{-1} Pa. Temperaturen måles enten på ydervæggen af den beholder, som indeholder prøven, eller i selve beholderen.

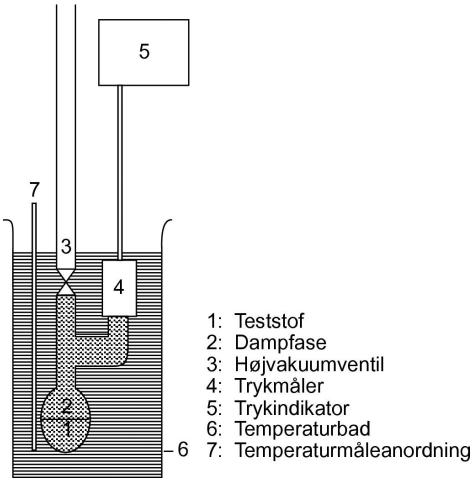
1.5.2.3. *Fremgangsmåde*

I det i figur 3a beskrevne apparatur fyldes U-røret med den valgte væske, som skal afgasses ved forhøjet temperatur, før der aflæses. Teststoffet anbringes i apparatet og afgasses ved reduceret temperatur. For prøver med flere komponenter skal temperaturen være tilstrækkelig lav til at sikre, at materialets sammensætning ikke ændres. Ligevægt kan nås hurtigere ved omrøring. Prøven kan køles med flydende nitrogen eller tøris, men der må udvises forsigtighed, så kondensation af luft eller pumpevæske undgås. Mens ventilen over prøvebeholderen er åben, tilsluttes sugningen i nogle minutter for at fjerne luften. Om nødvendigt gentages afgasningen nogle gange.

Figur 3a



Figur 3b



▼**M1**

Når prøven opvarmes med lukket ventil, stiger damptrykket. Derved ændres væskeligevægten i U-røret. For at kompensere herfor lukkes der nitrogen eller luft ind i apparatet, indtil differenstrykindikatoren igen viser nul. Det nødvendige tryk hertil kan aflæses på manometeret eller på et instrument med større præcision. Dette tryk svarer til stoffets damptryk ved måletemperaturen. På det i figur 3b viste apparatet aflæses damptrykket direkte.

Damptrykket bestemmes med passende små temperaturintervaller (ca. 5 til 10 målepunkter i alt) op til den ønskede maksimumtemperatur.

Lavtemperaturaflæsningerne skal gentages som kontrol. Hvis værdierne fra gentagelserne ikke falder sammen med den kurve, der er opnået ved stigende temperatur, kan dette have følgende årsager:

i) prøven indeholder stadig luft (f.eks. ved højviskøse materialer) eller flygtige stoffer, der frigives ved opvarmning

ii) stoffet undergår en kemisk reaktion i det undersøgte temperaturområde (f.eks. dekomposition eller polymerisering).

1.5.3. **Isoteniskop-metoden**

1.5.3.1. *Princip*

Isoteniskopet (6) bygger på den statiske metodes princip. I metoden anbringes en prøve i en kugle, der holdes ved konstant temperatur og er tilsluttet til et manometer og en vakuumpumpe. Urenheder, der er flygtigere end stoffet, fjernes ved afgasning ved reduceret tryk. Prøvens damptryk ved de valgte temperaturer afbalanceres ved et kendt tryk af inert gas. Isoteniskopet er oprindeligt udviklet til måling af damptrykket af visse flydende kulbrinter, men egner sig også til undersøgelse af faste stoffer. Metoden egner sig normalt ikke til systemer med flere komponenter. Resultaterne er kun behæftet med små fejl for prøver indeholdende ikke-flygtige urenheder. Det anbefalede område er 10^2 til 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Apparatur*

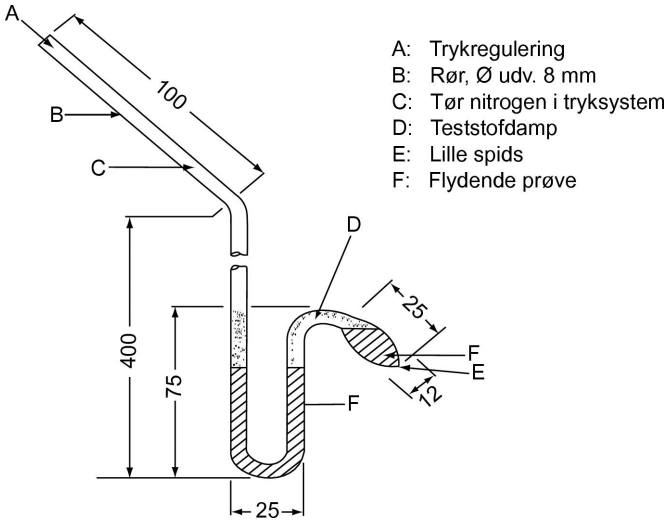
Et eksempel på en måleanordning er vist i figur 4. En komplet beskrivelse kan findes i ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Fremgangsmåde*

Når teststoffet er en væske, fungerer den selv som manometervæske i differensmanometeret. Isoteniskopet påfyldes så meget af væsken, at manometerets kugle og korte gren er fyldt. Isoteniskopet tilslutte et vakuumsystem og udpumpes, hvorefter det fyldes med nitrogen. Udpumpningen og gennemskylningen af systemet gentages to gange for at fjerne tilbageværende oxygen. Det påfyldte isoteniskop anbringes vandret, så prøven fordeler sig i et tyndt lag i prøvekuglen og manometeret. Trykket i systemet nedsættes til 133 Pa, og prøven opvarmes forsigtigt, til den netop koger (fjernelse af opløste gasser). Isoteniskopet anbringes derefter, så prøven løber tilbage i kuglen og fylder manometerets korte gren. Trykket holdes på 133 Pa. Prøvekuglens udtrukne spids opvarmes med en svag flamme, indtil den afgivne damp fra teststoffet har udvidet sig så meget, at en del af prøven fra den øverste del af kuglen og manometergrenen fortrænges ind i manometeret og derved danner et dampfyldt, nitrogenfrit rum. Isoteniskopet anbringes derefter i et termostatbad, og nitrogentrykket indstilles, til det er lig prøvens. I ligevægt er nitrogentrykket lig med teststoffets damptryk.

Figur 4



(alle mål i mm)

Til faste stoffer anvendes som manometervæske siliconeolie eller phthalater, afhængigt af tryk- og temperaturområdet. Den afgassede manometervæske fyldes i en udposning på isoteniskopets lange gren. Det faste stof, der skal undersøges, anbringes i prøvekuglen og afgasses ved en forhøjet temperatur. Derefter holdes isoteniskopet skråt, så manometervæsken kan løbe ind i U-røret.

▼M1

1.5.4. **Effusionsmetoden: damptrykvægt** (7)

1.5.4.1. *Princip*

Teststoffet opvarmes i en lille ovn og anbringes i en udpumpet glasklokke. Ovnen er dækket af et låg med små huller med kendt diameter. Den damp, som fra stoffet afgives gennem et af hullerne, ledes op mod vægtskålen på en meget fintmærkende vægt, der ligeledes er placeret i den udpumpede glasklokke. I nogle udformninger er vægtskålen omgivet af en køleboks, der leder varmen bort til omgivelserne ved varmeledning, og den køles ved stråling, så den udslippende damp kondenserer på den. Dampstrålens impuls påfører en kraft på vægten. Damptrykket kan beregnes på to måder: direkte af kraften på vægtskålen og af fordampningshastigheden ved hjælp af Hertz-Knudsen-ligningen (2):

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

hvor:

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

M = molær masse (g mol^{-1})

T = temperatur (K)

R = den universelle gaskonstant (J mol^{-1} K^{-1})

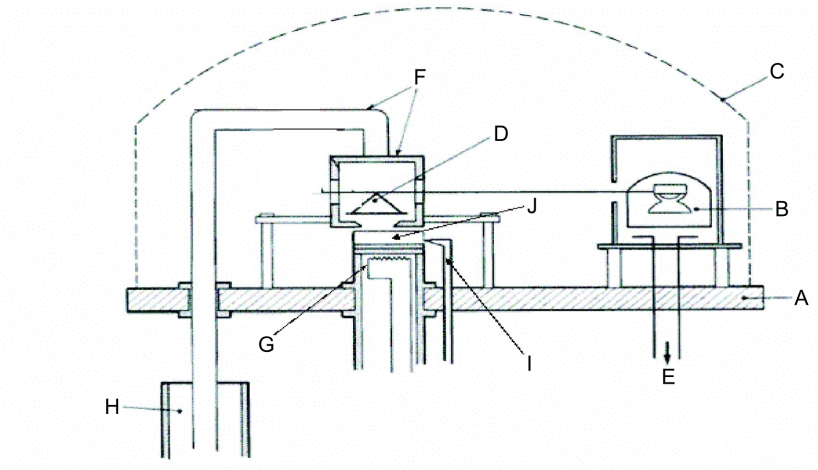
P = damptryk (Pa)

Det anbefalede område er 10^{-3} til 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparatur*

Det generelle princip i apparatet er vist i figur 5.

Figur 5



A:	Bundplade	F:	Køleboks og kølestang
B:	Drejespoleinstrument	G:	Muffelovn
C:	Glasklokke	H:	Dewarkar med flydende nitrogen
D:	Vægt med vægtskål	I:	Måling af prøvens temperatur
E:	Anordning til måling af vakuum	J:	Teststof

▼**M1**

1.5.5. **Effusionsmetoden: Knudsen-celle**

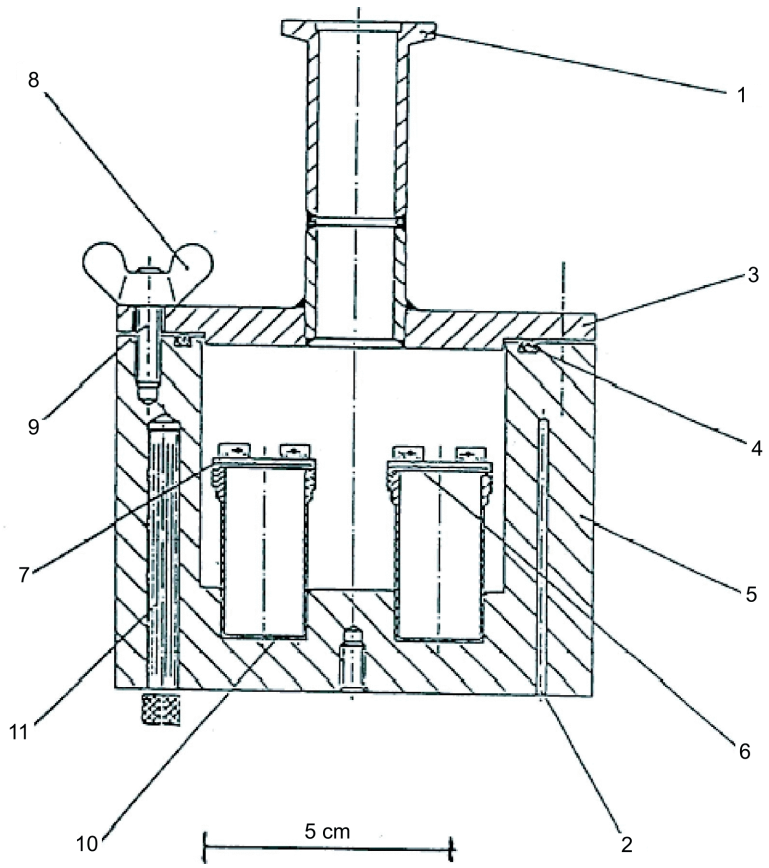
1.5.5.1. *Princip*

Metoden bygger på bestemmelse af den masse af dampformigt teststof, der pr. tidsenhed strømmer ud af en Knudsen-celle (8) gennem en mikroskopisk åbning under ekstremt vakuum. Massen af udstrømmede damp kan enten bestemmes af cellens massetab eller ved at lade dampen kondensere ved lav temperatur og bestemme den fordampede stofmængde ved kromatografi. Damptrykket beregnes ved at anvende Hertz-Knudsen-relationen (se punkt 1.5.4.1) med korrektionsfaktorer, der afhænger af apparaturets parametre (9). Det anbefalede område er 10^{-10} til 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparatur*

Apparatets generelle princip er illustreret i figur 6.

Figur 6



1:	Vakuumtilslutning	7:	Skruelåg
2:	Huller fra platinmodstandstermometer eller temperaturmåling og -kontrol	8:	Vingemøtrikker
3:	Låg til vakuumbeholder	9:	Bolte
4:	O-ring	10:	Effusionsceller af rustfrit stål
5:	Vakuumbeholder af aluminium	11:	Varmepatron
6:	Anordning til isætning og udtagning af effusionsceller		

▼M1

1.5.6. **Effusionsmetoden: isotermisk termogravimetri**

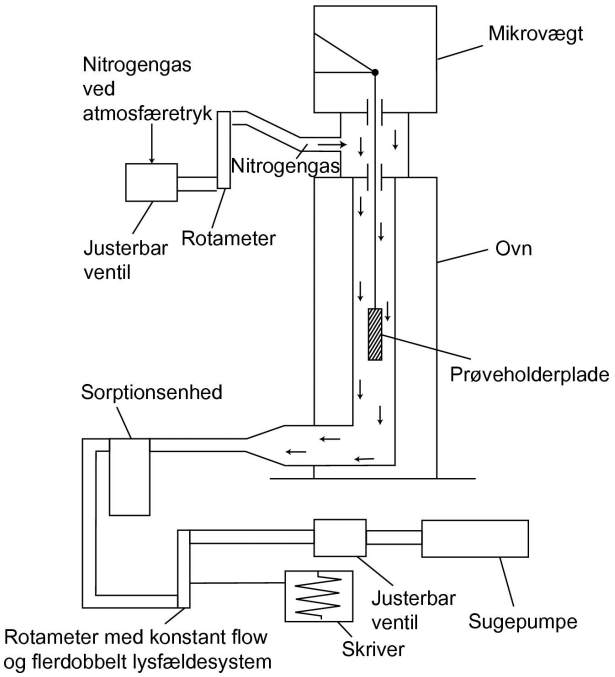
1.5.6.1. *Princip*

Metoden bygger på bestemmelse af stigningen i teststoffets fordampningshastighed ved forhøjet temperatur og atmosfæretryk ved hjælp af termogravimetri (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Fordampningshastighederne v_T bestemmes ved, at den valgte forbindelse eksponeres for en atmosfære af langsomt strømmende inert gas, mens vægttabet overvåges ved fastlagte isotermiske temperaturer T i kelvin i passende tidsrum. Damptrykkene p_T beregnes af v_T-værdierne ved udnyttelse af den lineære sammenhæng mellem logaritmen til damptrykket og logaritmen til fordampningshastigheden. Om nødvendigt kan der ekstrapoleres til temperaturerne 20 og 25 °C ved regressionsanalyse af log p_T som funktion af 1/T. Metoden er egnet til stoffer med damptryk helt ned til 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) og med en renhed så tæt som muligt på to 100 % for at undgå fejlfortolkning af målte vægttab.

1.5.6.2. *Apparatur*

Det generelle princip i testopstillingen er vist i figur 7.

Figur 7



Prøveholderpladen er ophængt i en mikrovægt i et kammer med kontrolleret temperatur, hvor der strømmer tør nitrogengas forbi den, som fjerner de fordampede molekyler af teststof. Efter at have forladt kammeret bliver gasstrømmen renset i en sorptionsenhed.

1.5.6.3. *Fremgangsmåde*

Teststoffet påføres som et homogent lag på en matteret glasplade. For faste stoffer vædes pladen ensartet med en opløsning af stoffet i et egnet opløsningsmiddel og tørres i inert atmosfære. Målingen sker ved, at den overtrukne plade hænges op i den termogravimetriske analysator, hvorefter dens vægttab registreres kontinuerligt som funktion af tiden.

▼**M1**

Fordampningshastigheden v_T ved en nærmere angivet temperatur beregnes af prøvepladens vægttab Dm ved hjælp af udtrykket

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

hvor F er teststoflagets overfladeareal, sædvanligvis prøvepladens overfladeareal, og t er tiden svarende til vægttabet Δm.

Damptrykket p_T beregnes af funktionen for fordampningshastigheden v_T:

$$\log p_T = C + D \log v_T$$

hvor C og D er konstanter, der er specifikke for den anvendte testopstilling og afhænger af målekammerets diameter og af gassens strømningshastighed. Disse konstanter bestemmes én gang for alle ved måling på et sæt forbindelser med kendt damptryk og regression af log p_T mod log v_T (11)(21)(22).

Sammenhængen mellem damptrykket p_T og temperaturen T i kelvin er givet ved

$$\log p_T = A + B \ 1/T$$

hvor A og B er konstanter, der fås ved regression af log p_T mod 1/T. Heraf kan damptrykket ved en vilkårlig temperatur beregnes ved ekstrapolation.

1.5.7. **Gasmætningsmetoden** (23)

1.5.7.1. *Princip*

En inert gas ledes ved rumtemperatur og med kendt flowhastighed gennem eller hen over en prøve af teststoffet, tilstrækkelig langsomt til at sikre mætning. Det er afgørende, at gassen når til mætning. Det transporterede stof opfanges, sædvanligvis med hjælp af et sorptionsmiddel, og dets mængde bestemmes. I stedet for opsamling af dampen og efterfølgende analyse kan man benytte in-line analyse, f.eks. ved gaskromatografi, til kvantitativ bestemmelse af den transporterede mængde materiale. Damptrykket beregnes, idet det forudsættes, at idealgasloven gælder, og at det totale tryk af en gasblanding er lig summen af gassernes partialtryk. Teststoffets partialtryk, dvs. damptrykket, beregnes af det kendte totale gasvolumen og vægten af det transporterede materiale.

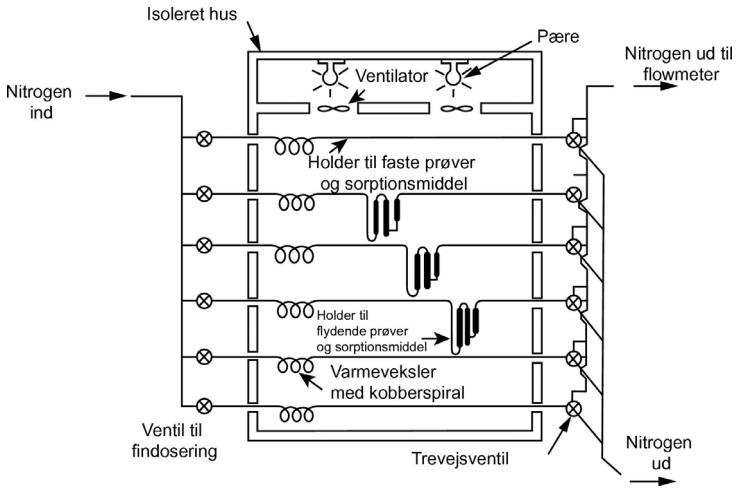
Gasmætningsmetoden er anvendelig på faste og flydende stoffer. Den kan anvendes på damptryk ned til 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoden er mest pålidelig ved damptryk under 10^3 Pa. Over 10^3 Pa bliver damptrykket sædvanligvis overvurderet, antagelig som følge af aerosoldannelse. Da damptrykket måles ved stuetemperatur, undgår man at skulle ekstrapolere fra høje temperaturer, hvilket ofte kan medføre alvorlige fejl.

1.5.7.2. *Apparatur*

Metoden kræver brug af et termostateret hus. Skitsen i figur 8 viser et hus, der med tre holdere til faste og tre til flydende prøver giver mulighed for tredobbelte analyser af enten et fast eller et flydende teststof. Temperaturen styres med en nøjagtighed på ± 0,5 °C eller bedre.

▼**M1**

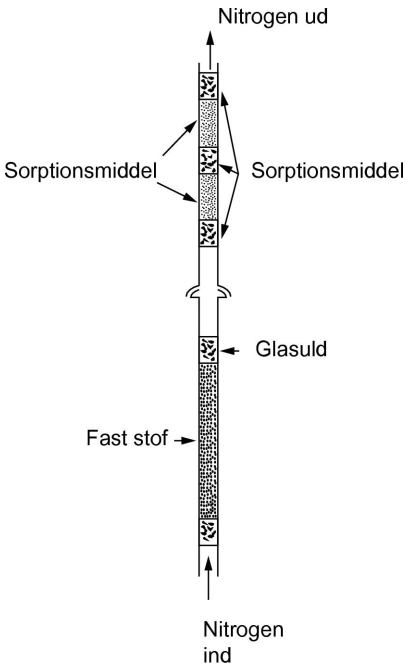
Figur 8



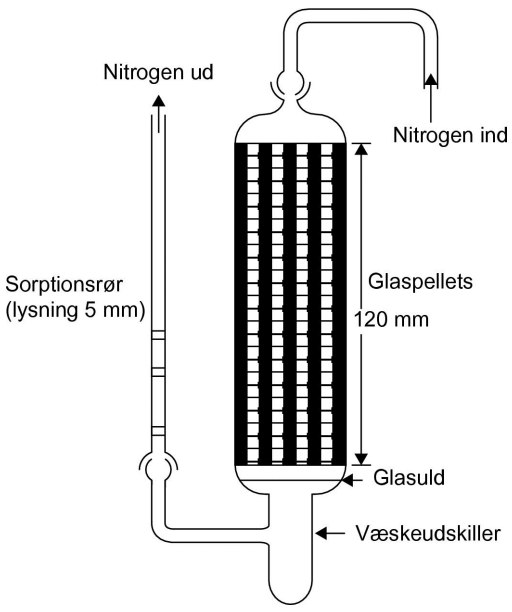
Som bæregas anvendes sædvanligvis nitrogen, men brug af en anden gas kan undertiden være nødvendig (24). Bæregassen skal være tør. Gasstrømmen opdeles i 6 strømme, der styres ved hjælp af nåleventiler (med en åbning på ca. 0,79 mm) og ledes ind i huset gennem et kobberrør med en lysning på 3,8 mm. Efter temperaturudligning ledes gassen gennem prøven og sorptionsfælden og forlader huset.

Faste prøver anbringes med glasuldspropper på hver side i et glasrør med 5 mm lysning (se figur 9). Figur 10 viser en prøveholder til væskeformige prøver og sorptionssystemet. Den mest reproducerbare metode til måling af væskers damptryk er at påføre væsken på glaspellets eller på et inert sorptionsmiddel såsom silica og pakke holderen med disse pellets. Bæregassen kan i stedet ledes gennem en grov glasfritte og gennemboble en kolonne med flydende teststof.

Figur 9



Figur 10



▼**M1**

Sorptionssystemet indeholder en forreste sorptionssektion og en backup-sorptionssektion. Ved meget lave damptryk et det kun små mængder, der indfanges af sorptionsmidlet, og adsorption til glasulden og glasrøret mellem prøven og sorptionsmidlet kan være et alvorligt problem.

En anden effektiv metode til opsamling af det fordampede materiale er dampfælder kølet med tøris. De giver ikke modtryk i mætningskolonnen, og det opfangede materiale kan let fjernes fuldstændigt.

1.5.7.3. *Fremgangsmåde*

Flowhastigheden af den udstrømmende bæregas måles ved rumtemperatur. Flowhastigheden kontrolleres ofte under testen for at sikre nøjagtig bestemmelse af det totale volumen bæregas. Hertil bør fortrinsvis anvendes kontinuerlig overvågning med et masseflowmeter. For at gasfasen skal blive mættet, kan det være nødvendigt med en ret lang kontakttid og dermed en lav flowhastighed af gassen (25).

Ved testens slutning skal den forreste sorptionssektion og backup-sorptionssektionen analyseres hver for sig. Stoffet på hver sektion desorberes ved tilsætning af et opløsningsmiddel. De resulterende opløsninger analyseres kvantitativt til bestemmelse af den desorberede vægt fra hver sektion. Valg af analysemetode (herunder valg af sorptionsmiddel og opløsningsmiddel til desorption) træffes ud fra teststoffets beskaffenhed. Effektiviteten af desorptionen bestemmes ved, at en kendt mængde teststof injiceres på sorptionsmidlet, hvorefter det desorberes, og den genfundne mængde bestemmes. Det er vigtigt at bestemme effektiviteten af desorptionen ved en koncentration svarende til prøvens og under samme betingelser som i testen.

For at sikre, at bæregassen er mættet med teststof, anvendes tre forskellige flowhastigheder af gassen. Hvis det beregnede damptryk viser sig at være uafhængigt af flowhastigheden, kan gassen antages at være mættet.

Damptrykket beregnes af udtrykket:

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

hvor:

P = damptryk (Pa)

W = masse af det fordampede teststof (g)

V = volumen af den mættede gas (m^3)

R = den universelle gaskonstant 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatur (K)

M = teststoffets molmasse (g mol^{-1})

De målte volumener skal korrigeres for tryk- og temperaturforskelle mellem flowmeteret og mætningskolonnen.

▼M1

1.5.8. **Roterende kugle**

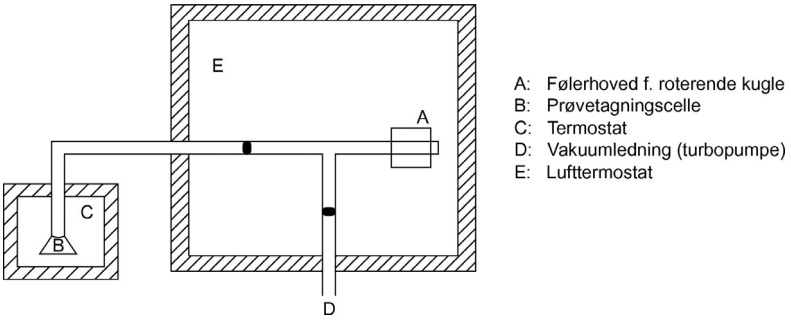
1.5.8.1. *Princip*

I metoden anvendes et viskosimeter, hvis måleelement er en lille stålkugle, som holdes svævende i et magnetisk felt og sættes i rotation af roterende felter (26)(27)(28). Kuglens rotationshastighed måles med detektorspoler. Når kuglen har nået en given rotationshastighed, sædvanligvis ca. 400 o./min., standses energitilførslen til kuglen, som derefter bremses af gasfriktionen. Faldet i rotationshastigheden registreres som funktion af tiden. Damptrykket afledes af den trykafhængige nedbremsning af stålkuglen. Det anbefalede område er 10^{-4} til 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparatur*

Testopstillingen er vist skematisk i figur 11. Målehovedet er placeret i et termostateret hus, der er reguleret inden for 0,1 °C. Prøveholderen er placeret i et separat hus, der ligeledes er reguleret inden for 0,1 °C. Alle de øvrige dele af testopstillingen holdes ved højere temperatur for at undgå kondensation. Hele apparatet er tilsluttet et højvakuum-system.

Figur 11



2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Damptrykket skal bestemmes ved mindst to temperaturer med en af ovenstående metoder. I området 0 til 50 °C bør fortrinsvis anvendes tre eller flere temperaturer for at eftervise damptrykkurvens linearitet. Ved effusionsmetoden (Knudsen-celle og isotermisk termogravimetri) og ved gasmætningsmetoden anbefales 120 til 150 °C som temperaturområde for målingen i stedet for 0 til 50 °C.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— den anvendte metode

▼M1

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder) og eventuelle indledende rensningstrin

— mindst to værdier af damptryk og temperatur (helst tre eller flere) — i området fra 0 til 50 °C (eller 120 til 150 °C)

— mindst en af temperaturerne bør være 25 °C eller derunder, hvis dette er teknisk muligt med den valgte metode

— alle originale data

— en kurve over log p som funktion af 1/T

— et beregnet damptryk ved 20 eller 25 °C.

Hvis der iagttages en omdannelse (tilstandsændring, dekomposition), skal følgende oplysninger noteres:

— ændringens art

— den temperatur, ved hvilken ændringen finder sted ved atmosfæretryk

— damptryk ved 10 og 20 °C under omdannelsestemperaturen og 10 og 20 °C over denne temperatur (bortset fra omdannelse fra fast stof til gas).

Alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne, skal rapporteres, specielt hvad angår urenheder og stoffets fysiske tilstand.

3. **LITTERATUR**

(1) *De Europæiske Fællesskabers Tidende* L 383 A, 26-47 (1992).

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Tillæg

Metode til tilnærmet beregning

INDLEDNING

Tilnærmede værdier af damptrykket kan anvendes:

— til at afgøre, hvilken testmetode der er velegnet

— til at give et skøn eller en grænseværdi i tilfælde, hvor den eksperimentelle metode af tekniske grunde ikke kan anvendes.

METODE TIL TILNÆRMET BEREGNING

Damptrykket af faste stoffer og væsker kan beregnes tilnærmet med den modificerede Watson-korrelation (a). De eneste eksperimentelle data, der kræves, er det normale kogepunkt. Metoden kan anvendes i hele trykområdet fra 10^5 Pa til 10^{-5} Pa.

Detaljerede oplysninger om metoden findes i »Handbook of Chemical Property Estimation Methods« (b). Se også OECD Environmental Monograph No.67 (c).

BEREGNINGSMETODE

Damptrykket beregnes af følgende udtryk:

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

hvor:

T = den betragtede temperatur

T_b = normalkogepunktet

P_{vp} = damptrykket ved temperaturen T

ΔH_{vb} = fordampningsvarmen

ΔZ_b = kompressibilitetsfaktoren (anslået værdi 0,97)

m = en empirisk faktor, der afhænger af den fysiske tilstand ved den betragtede temperatur

Endvidere gælder:

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

hvor K_F er en empirisk faktor, der tager hensyn til stoffets polaritet. Faktoren K_F er for en række forbindelser af forskellig art angivet i reference (b).

▼**M1**

I mange tilfælde indeholder de foreliggende data en angivelse af kogepunktet ved reduceret tryk. I så fald beregnes damptrykket af følgende udtryk:

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

hvor T_1 er kogepunktet ved det reducerede tryk P_1.

RAPPORT

Hvis den tilnærmede beregningsmetode anvendes, skal beregningen være fuldstændig dokumenteret i rapporten.

REFERENCER

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

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

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

▼B

A.5. OVERFLADESPÆNDING

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder anvendes til måling af vandige opløsningers overfladespænding.

Ved udførelsen af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets vandopløselighed, struktur, hydrolyseegenskaber og kritiske koncentrationer for micelledannelse.

De følgende metoder kan anvendes for de fleste kemiske stoffer uanset renheden.

Måling af overfladespænding ved ringtensiometermetoden er begrænset til vandige opløsninger med en dynamisk viskositet på mindre end ca. 200 mPa s.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den frie overfladeenthalpi pr. overfladearealenhed betegnes som overfladespændingen.

Overfladespændingen angives i:

N/m (SI-enhed) eller

mN/m (SI-underenhed)

$1\ N/m = 10^3\ dyn/cm$

1 mN/m = 1 dyn/cm i det gamle cgs-system

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Referencestoffer, som dækker et bredt udvalg af overfladespændinger, er angivet i henvisning (1) og (3).

1.4. METODERNES PRINCIP

Metoderne er baseret på måling af den største kraft, der skal udøves lodret på en stigbøjle eller ring i kontakt med væskeoverfladen af en prøve i et målekar, for at denne kontakt brydes, eller den lodrette kraft, som skal udøves på en plade, hvis ene kant er i kontakt med prøvens overflade, for at den dannede hinde brydes.

Stoffer, hvis opløselighed i vand er mindst 1 mg/l, testes i vandig opløsning ved én koncentration.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Disse metoder kan give større nøjagtighed, end der må forventes krævet ved miljøvurderinger.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Der fremstilles en opløsning af stoffet i destilleret vand. Koncentrationen af denne opløsning skal være 90 % af stoffets mætningskoncentration i vand; er denne koncentration større end 1 g/l, benyttes der en koncentration på 1 g/l til testen. Stoffer med en opløselighed i vand på mindre end 1 mg/l behøver ikke at testes.

1.6.1. **Plademetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Stigbøjlemetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Ringmetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD-harmoniseret ringmetode**

1.6.4.1. *Apparatur*

Kommercielt tilgængelige tensiometre er tilstrækkelige til denne måling. De består af følgende dele:

— bevægeligt prøvebord

— kraftmålingssystem

— målelegeme (ring)

— målekar.

1.6.4.1.1. Bevægeligt prøvebord

Det bevægelige prøvebord anvendes til understøttelse af det termostaterede målekar, som rummer den væske, der skal undersøges. Sammen med kraftmålingssystemet er det monteret på et stativ.

1.6.4.1.2. Kraftmålingssystem

Kraftmålingssystemet (se figuren) er placeret over prøvebordet. Usikkerheden ved kraftmålingen må ikke overstige ± 10^{-6} N, svarende til en usikkerhed på ± 0,1 mg ved en vejning. Oftest er måleskalæn på de kommercielt tilgængelige tensiometre inddelt i mN/m, således at overfladespændingen direkte kan aflæses i mN/m med en nøjagtighed på 0,1 mN/m.

▼B

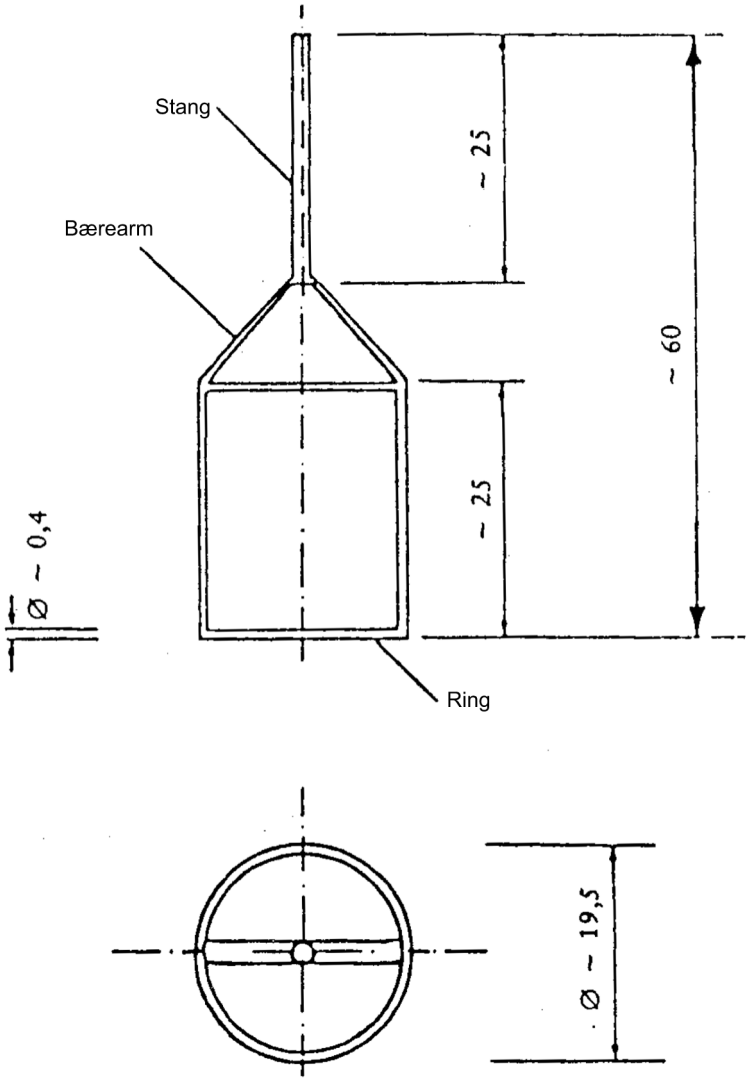
1.6.4.1.3. Målelegeme (ring)

Ringen er sædvanligvis fremstillet af en platin-iridium-tråd med en tykkelse på ca. 0,4 mm og en middelomkreds på 60 mm. Trådringen er ophængt vandret fra en metalstang og en trådbærearm, som danner forbindelsen til kraftmålingssystemet (se figuren).

Figur

Målelegeme

(alle dimensioner er i mm)



1.6.4.1.4. Målekar

Målekarret, som rummer testopløsningen, skal være et termostateret glaskar. Det skal have en sådan form, at temperaturen af testopløsningen og gasfasen herover er konstant under målingen, og at prøven ikke kan fordampe. Cylindriske glaskar med en indre diameter på mindst 45 mm er acceptable.

▼B

1.6.4.2. *Klargøring af apparatet*

1.6.4.2.1. Rengøring

Glaskar rengøres omhyggeligt. Om nødvendigt vaskes de først med varm chromsvovlsyre og dernæst med en tyktflydende phosphorsyreopløsning (83 til 98 w/w % H_3PO_4). Herefter skylles omhyggeligt i ledningsvand og endelig vaskes i redestilleret vand til neutral reaktion. Til sidst tørres karrene, eller de skylles i noget af den prøvevæske, som skal måles.

Ringen renses først grundigt i vand, så alle vandopløselige stoffer fjernes. Derefter nedsænkes den et øjeblik i chromsvovlsyre, skylles i redestilleret vand til neutral reaktion og opvarmes til sidst et øjeblik over en methanolflamme.

Bemærk:

Forurening med stoffer, som ikke opløses eller destrueres af chromsvovlsyre eller phosphorsyre, som f.eks. silikoner, fjernes ved hjælp af et passende organisk opløsningsmiddel.

1.6.4.2.2. Kalibrering af apparatet

Apparatet klargøres ved, at nulpunktet justeres, og apparatet indstilles til pålidelig aflæsning i mN/m.

Opstilling:

Apparatet skal stilles i vater, f.eks. ved hjælp af et vaterpas på tensiometrets fod, idet man justerer stilleskruerne.

Nulpunktsindstilling:

Efter montering af ringen i apparatet, men inden den nedsænkes i væsken, skal tensiometerviseren indstilles på nul, og man kontrollerer, at ringen er parallel med væskeoverfladen. Til dette kan væskeoverfladen anvendes som et spejl.

Kalibreringer:

Prøvekalibreringen kan udføres ved en af de følgende to metoder:

a) ved hjælp af lodder: dette er en fremgangsmåde, hvor ryttere af kendt masse mellem 0,1 og 1,0 g anbringes på ringen. Kalibreringsfaktoren Φ_a, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (1).

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

hvor:

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

m = rytterens masse (g)

g = tyngdeaccelerationen (981 cm s^{-2} ved havoverfladen)

b = ringens middelomkreds (cm)

σ_a = tensiometeraflæsningen efter anbringelse af rytteren på ringen (mN/m).

▼B

b) ved hjælp af vand: dette er en fremgangsmåde, hvor der anvendes rent vand, hvis overfladespænding ved f.eks. 23 °C er 72,3 mN/m. Denne fremgangsmåde er hurtigere at udføre end vægtkalibreringen, men der er altid risiko for, at vandets overfladespænding er ændret ved forurening med spor af overfladeaktive stoffer.

Kalibreringsfaktoren, Φ_b, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (2).

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

hvor:

σ_o = litteraturværdi for vands overfladespænding (mN/m)

σ_g = målt værdi for vands overfladespænding (mN/m) ved samme temperatur

1.6.4.3. *Testforberedelse*

Der fremstilles vandige opløsninger med passende koncentrationer af de stoffer, som skal undersøges. Opløsningerne må ikke indeholde uopløst stof.

Opløsningerne holdes ved konstant temperatur (± 0,5 °C). Idet en opløsnings overfladespænding ændres i målekarret med tiden, må der foretages adskillige målinger på forskellige tidspunkter, og der afsættes en kurve, der viser overfladespændingen som funktion af tiden. Når overfladespændingen ikke ændres yderligere, er ligevægtstilstanden nået.

Støv og gasformig forurening med andre stoffer forstyrrer målingen, hvorfor arbejdet bør udføres under et beskyttende dække.

1.6.5. **Testbetingelser**

Målingerne foretages ved ca. 20 °C, og temperaturen skal holdes inden for ± 0,5 °C.

1.6.6. **Udførelse af testen**

De opløsninger, som skal måles, fyldes i det omhyggeligt rengjorte målekar, idet man undgår skumning. Målekarret anbringes på apparatets prøvebord. Bordet med målekarret hæves, indtil ringen er nedsænket fuldstændigt i den opløsning, som skal måles. Derefter sænkes bordet jævnt og gradvis (med en hastighed på ca. 0,5 cm/min) for at løsrive ringen fra overfladen, indtil den største kraft er nået. Det væskelag, som hænger ved ringen, må ikke fjernes fra denne. Når målingen er udført, nedsænkes ringen atter i væsken, og målingen gentages, indtil der opnås konstante værdier for overfladespændingen. Den tid, der er gået fra overførsel af opløsningen til målekarret og til selve målingen udføres, noteres ved hver bestemmelse. Aflæsningerne skal foretages ved den største kraft, som kræves til løsrivning af ringen fra væskeoverfladen.

▼B

2. **DATA**

For at beregne overfladespændingen skal den værdi, som er aflæst i mN/m på apparatet, først multipliceres med kalibreringsfaktoren Φ_a eller Φ_b (afhængigt af den anvendte kalibreringsmetode). Dette giver en værdi, som kun gælder tilnærmelsesvis, og som derfor kræver korrektion.

Harkins og Jordan (4) har empirisk bestemt korrektionsfaktorer for værdier af overfladespændingen, som er bestemt med ringmetoden; disse faktorer afhænger af ringens dimensioner, væskens massefylde og dens overfladespænding.

Da det er besværligt for hver enkelt måling at bestemme korrektionsfaktoren ud fra Harkins og Jordans tabeller for at beregne overfladespænding, kan man for vandige opløsninger benytte en forenklet metode, hvor de korrigerede værdier for overfladespændingen direkte aflæses i den nedenstående tabel (der anvendes interpolation til aflæsninger, som ligger mellem tabelværdierne).

Tabel

Korrektion af den målte overfladespænding

Kun for vandige opløsninger, p = 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (gennemsnitlig ringradius)
r	= 0,185 mm (ringtrådens radius)

Eksperimentel værdi (mN/m)	Korrigeret værdi (mN/m)	
	kalibrering med lodder (se 1.6.4.2.2. a))	kalibrering med vand (se 1.6.4.2.2. b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Eksperimentel værdi (mN/m)	Korrigeret værdi (mN/m)	
	kalibrering med lodder (se 1.6.4.2.2. a))	kalibrering med vand (se 1.6.4.2.2. b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Denne tabel er udarbejdet på basis af Harkins-Jordan korrektioner, og ligner den, der er i DIN-standarden (DIN 53914) for vand og vandige opløsninger (massefylde $\rho = 1\ g/cm^3$) og for en kommerciel tilgængelig ring med dimensionerne R = 9,55 mm (middelringradius) og r = 0,185 mm (ringtrådens radius). Tabellen angiver korrigerede værdier for overfladespændingsmålinger, der er foretaget efter kalibrering med lodder eller vand.

Alternativt kan overfladespændingen uden forudgående kalibrering beregnes efter følgende formel:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

hvor:

F = kraften målt på dynamometeret, idet hinden brydes

R = ringens radius

f = korrektionsfaktoren (1)

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— anvendt type vand eller opløsning

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— måleresultater: overfladespænding (aflæsning) med angivelse af både de enkelte målinger, deres middelværdi og den korrigerede middelværdi (med hensyn til apparatfaktoren og korrektionstabellen)

▼B

— opløsningens koncentration

— testtemperaturen

— den anvendte opløsnings alder, og specielt den tid, der er forløbet mellem fremstillingen af opløsningen og målingen

— beskrivelse af overfladespændingens tidsafhængighed efter overførsel til målekarret

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstandsform.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

På baggrund af vands overfladespænding på 72,75 mN/m ved 20 °C anses stoffer med en overfladespænding på mindre end 60 mN/m bestemt ved denne metode for at være overfladeaktive.

4. **HENVISNINGER**

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

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

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

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

▼M4

A.6. VANDOPLØSELIGHED

INDLEDNING

1. Denne metode svarer til OECD Test Guideline (TG) 105 (1995). Denne metode er en revideret version af den oprindelige TG 105, som blev vedtaget i 1981. Der er ingen indholdsmæssig forskel mellem den nuværende version og versionen fra 1981. Det er primært formatet, som er ændret. Revisionen var baseret på EU-testmetoden »Vandopløselighed« (1).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Et stofs vandopløselighed kan i betragtelig grad afhænge af tilstedeværelsen af urenheder. Metoden omfatter bestemmelse af opløseligheden i vand af stoffer, som i det væsentlige er rene, og som er stabile i vand og ikke flygtige. Inden vandopløseligheden bestemmes, er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om teststoffets strukturformel, damptryk, dissociationskonstant og hydrolyse som funktion af pH.

3. To metoder, kolonne-eluerings-metoden og kolbe-metoden, som omfatter opløselighed henholdsvis under og over 10^{-2} g/l, er beskrevet i denne testmetode. En simpel foreløbig test er også beskrevet. Den gør det muligt at bestemme, hvor meget materiale der omtrentligt skal anvendes i den endelige test, og hvor lang tid der omtrentligt kræves til at opnå mætning.

DEFINITIONER OG ENHEDER

4. Et stofs opløselighed i vand er mætningskoncentrationen af stoffet i vand ved en given temperatur.

5. Opløselighed i vand angives i masse pr. rumfang opløsning. SI-enheden er kg/m^3 (g/l kan dog også anvendes).

REFERENCEKEMIKALIER

6. Anvendelse af referencekemikalier er ikke påkrævet, når et teststof skal undersøges.

BESKRIVELSE AF METODERNE

Testbetingelser

7. Testen udføres helst ved 20 °C ± 0,5 °C. Den valgte temperatur bør holdes konstant i alle relevante dele af udstyret.

Indledende test

8. Stigende mængder vand tilsættes trinvist ved stuetemperatur til ca. 0,1 g af prøven (faste teststoffer skal være pulveriserede) i et 10 ml måleglas med glasprop. Efter hver tilsætning af vand omrystes blandingen kraftigt i 10 minutter, og det undersøges visuelt, om der er noget uopløst af prøven tilbage. Hvis prøven eller dele af prøven forbliver uopløst, efter at der er tilsat 10 ml vand, fortsættes testen i et 100 ml måleglas. Den anslåede opløselighed er angivet i tabel 1 nedenfor under den mængde tilsat vand, der netop forårsagede en fuldstændig opløsning af prøven. Hvis opløseligheden er lav, kan det tage lang tid at opløse et teststof, og henstandstiden

▼M4

øges til mindst 24 timer. Hvis teststoffet stadig ikke er opløst efter 24 timer, øges henstandstiden yderligere (op til 96 timer), eller der foretages yderligere fortynding, så det kan afgøres, om kolonne-eluerings- eller kolbe-metoden skal anvendes.

Tabel 1

ml vand til 0,1 g opløseligt stof	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
omtrentlig opløselighed i g/l	> 1 000	1 000 til 200	200 til 100	100 til 50	50 til 10	10 til 1	< 1

Kolonne-eluerings-metoden

Princip

9. Denne metode er baseret på eluering af teststoffet med vand fra en mikrokolonne, der indeholder et inert bærematerialе, som er belagt med overskud af teststoffet (2). Opløseligheden i vand angives ved massekoncentrationen i eluatet, når den har nået et plateau som en funktion af tiden.

Apparatur

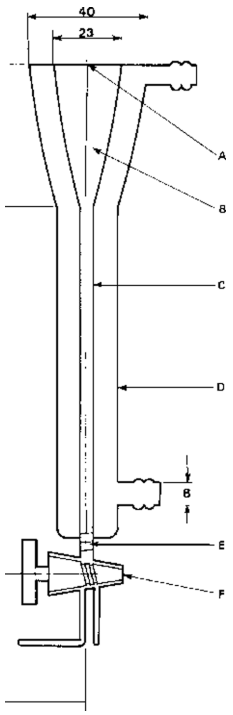
10. Apparaturet består af en mikrokolonne (figur 1), som holdes ved konstant temperatur. Den er forbundet til en recirkulationspumpe (figur 2) eller en niveaubeholder (figur 3). Mikrokolonnen indeholder et inert bærematerialе, som holdes på plads af en lille prop af glasuld, der også fungerer som filter for partikler. Mulige materialer, der kan anvendes som bærematerialе, er glaskugler, diatoméjord eller andet inert materialе.

11. Mikrokolonnen i figur 1 kan anvendes til konfigurationen med recirkulationspumpe. Den har et headspace, der sikrer plads til fem bed-rumfang (som kasseres ved begyndelsen af testen) og rumfanget af fem prøver (som udtages til analyse under testen). Alternativt kan størrelsen reduceres, hvis vand kan tilsættes systemet under testen som erstatning for de første fem bed-rumfang, der fjernes med urenheder. Kolonnen tilsluttes med slange fremstillet af et inert materialе til recirkulationspumpen, som kan levere ca. 25 ml/h. Recirkulationspumpen kan f.eks. være en slangepumpe eller en membranpumpe. Det skal omhyggeligt sikres, at der ikke sker kontaminering af og/eller adsorption på slangematerialet.

12. Et system med niveaubeholder er vist skematisk i figur 3. I dette system er mikrokolonnen udstyret med en envejsstophane. Tilslutningen til niveaubeholderen består af en glasslibforbindelse og slange fremstillet af et inert materialе. Flowhastigheden fra niveaubeholderen bør være ca. 25 ml/h.

▼**M4**

Figur 1



Mål i mm

A. Forbindelse til glasslib

B. Headspace

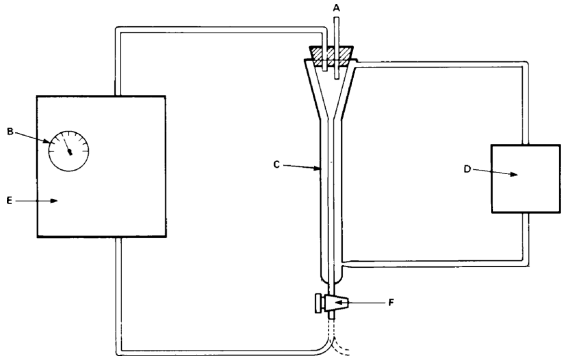
C. Indvendig: 5

D. Udvendig: 19

E. Glasuldsprop

F. Stophane

Figur 2



A. Ligevægt til atmosfæren

B. Flowmeter

C. Mikrokolonne

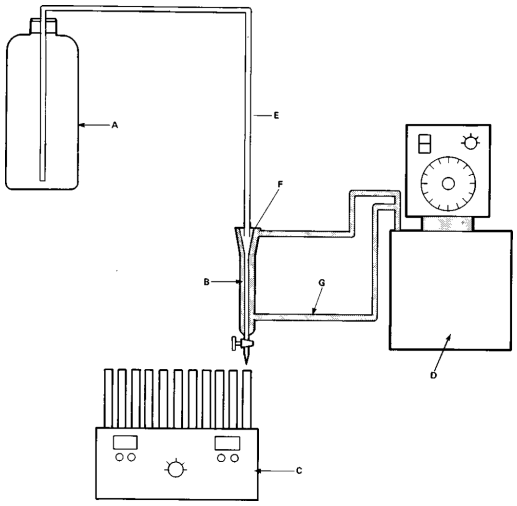
D. Termostatstyret cirkulationspumpe

E. Recirkulationspumpe

F. Tovejshane til prøveudtagning

▼**M4**

Figur 3



A. Niveaubeholder (f.eks. 2,5 l standflaske)

B. Kolonne

C. Fraktionssamler

D. Termostat

E. Teflonslange

F. Glasslibforbindelse

G. Vandslange (mellem termostat og kolonne, indre diameter: ca. 8 mm)

13. Ca. 600 mg bærematerialе overføres til en 50 ml rundbundet kolbe. En passende mængde af teststoffet opløses i et flygtigt opløsningsmiddel af analysekvalitet, og en passende mængde af denne opløsning tilsættes bærematerialet. Opløsningsmidlet afdampes fuldstændigt, f.eks. i en rotationsfordamper, da bærematerialet ellers ikke kan vandmættes i elueringstrinnet som følge af fordelingseffekter på overfladen. Det behandlede bærematerialе henstilles til kvældning i to timer i ca. 5 ml vand, hvorefter suspensionen overføres til mikrokolonnen. Alternativt kan det tørre behandlede bærematerialе hældes i mikrokolonnen, der er fyldt med vand, og derefter henstå i ca. to timer til opnåelse af ligevægt.

14. Afsætningen på bærematerialet kan give problemer, der kan føre til fejlagtige resultater, f.eks. hvis teststoffet afsættes som en olie. Sådanne problemer bør undersøges, og detaljerne bør rapporteres.

Fremgangsmåde baseret på recirkulationspumpe

15. Væskestrømmen gennem kolonnen startes. Det anbefales at bruge en flowhastighed på ca. 25 ml/h, hvilket svarer til ca. 10 bed-rumfang pr. time for den beskrevne kolonne. Som minimum kasseres de første fem bed-rumfang, så vandopløselige urenheder fjernes. Derefter køres pumpen, indtil der er opnået ligevægt, defineret ved, at fem på hinanden følgende prøver giver koncentrationer, der ikke afviger mere end ± 30 % på tilfældig måde. Disse prøver bør være adskilt fra hinanden ved tidsintervaller, der svarer til et gennemløb af mindst 10 bed-rumfang. Afhængigt af den anvendte analysemetode kan det med fordel påvises ved hjælp af en kurve over koncentration/tid, at ligevægt er opnået.

▼M4

Fremgangsmåde baseret på niveaubeholder

16. Successive fraktioner af eluatet opsamles og analyseres ved hjælp af den valgte metode. Fraktioner fra det midterste elueringsområde, hvor koncentrationerne er konstante inden for ± 30 % i mindst fem på hinanden følgende prøver, anvendes til at bestemme opløseligheden.

17. Dobbeltdestilleret vand er den foretrukne eluent. Deioniseret vand med en modstand over 10 megohm/cm og et samlet indhold af organisk kulstof under 0,01 % kan også anvendes.

18. Ved begge fremgangsmåder udføres endnu et forsøg med halvt så høj flowhastighed som det første. Hvis resultaterne fra de to forsøg stemmer overens, er testen tilfredsstillende. Hvis den målte opløselighed er højere ved den lavere flowhastighed, skal halveringen af flowhastigheden fortsættes, indtil to på hinanden følgende forsøg giver samme opløselighed.

19. Ved begge fremgangsmetoder kontrolleres fraktionerne for tilstedeværelse af kolloidt materiale ved hjælp af Tyndall-effekten. Tilstedeværelse af partikler gør testen værdiløs, og den bør gentages efter forbedring af kolonnens filtreringsfunktion.

20. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

Kolbe-metoden

Princip

21. Teststoffet opløses (faste stoffer skal være pulveriserede) i vand ved en temperatur noget over testtemperaturen. Når mætning er opnået, afkøles blandingen og opbevares ved testtemperatur. Hvis det ved passende prøvetagning i øvrigt sikres, at mætningsligevægten er nået, kan målingen foretages direkte ved testtemperaturen. Derefter bestemmes massekoncentrationen af teststoffet i den vandige opløsning, der ikke må indeholde uopløste partikler, ved hjælp af en passende analysemetode (3).

Apparatur

22. Der er behov for følgende materialer:

— normalt laboratorieglasudstyr og -instrumentering

— udstyr til rystning/omrøring af opløsninger ved kontrolleret konstant temperatur

— eventuelt en centrifuge (helst termostateret) til emulsioner og

— analyseudstyr.

Fremgangsmåde

23. Den mængde teststof, der er nødvendig for at mætte det ønskede rumfang vand, anslås ud fra den foreløbige test. Ca. fem gange denne mængde stof afvejes i hver af tre glasbeholdere med glasprop (f.eks. centrifugeglas eller kolber). En mængde vand, der er bestemt ved hjælp af analysemetoden og opløselighedsområdet, tilsættes hver beholder. Beholderne lukkes tæt til og omrystes ved 30 °C. Der anvendes ryste- eller omrørerudstyr, som kan operere ved konstant temperatur, f.eks. magnetomrøring i et termostatbad. Efter en dag henstilles én af beholderne til opnåelse af ligevægt i 24 timer ved testtemperaturen, og den rystes lejlighedsvis. Indholdet i beholderen centrifugeres derefter ved testtemperaturen, og koncentrationen af teststoffet i den klare vandige fase bestemmes med en passende analysemetode. De andre to kolber behandles på samme måde efter forudgående opnåelse af

▼M4

ligevægt ved 30 °C i henholdsvis to og tre dage. Hvis de koncentrationer, der måles i mindst to af beholderne, ikke adskiller sig med mere end 15 %, er testen tilfredsstillende. Hvis resultaterne fra beholder 1, 2 og 3 viser en stigende tendens, gentages hele testen med længere tider til opnåelse af ligevægt.

24. Testen kan også udføres uden forudgående henstand ved 30 °C. Der opnås et skøn over, hvor hurtigt mætningsligevægten indstiller sig, ved udtagning af prøver, indtil omrøringstiden ikke længere indvirker på de målte koncentrationer.

25. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

Analytiske bestemmelser

26. Der foretrækkes en stofspecifik analysemetode, eftersom små mængder af opløselige urenheder kan forårsage store fejl i den målte opløselighed. Eksempler på sådanne metoder omfatter gas- eller væskekromatografi, titrering, fotometri og voltametri.

DATA OG RAPPORTERING

Data

Kolonne-eluerings-metoden

27. For hvert forsøg udregnes middelværdien og standardafvigelsen for mindst fem på hinanden følgende prøver udtaget ved mætningsplateauet. Forskellen mellem middelværdierne fra to test med forskellige flowhastigheder må ikke være større end 30 %.

Kolbe-metoden

28. Der beregnes et gennemsnit af de enkelte resultater fra hver af de tre kolber, og forskellen mellem dem må ikke være større end 15 %.

Testrapport

Kolonne-eluerings-metoden

29. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)

— koncentration, flowhastighed og pH for hver enkelt prøve

— middelværdi og standardafvigelse for mindst fem prøver fra mætningsplateauet fra hvert forsøg

— gennemsnittet af to successive, acceptable forsøg

— vandtemperaturen under mætningsprocessen

— analysemetoden

— arten af det anvendte bæremateriale

— afsætning på bæremateriale

— anvendt opløsningsmiddel

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

▼**M4**

Kolbe-metoden

30. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)

— de enkelte analyseresultater og gennemsnittet, når der er bestemt mere end én værdi for hver kolbe

— pH af hver enkelt prøve

— gennemsnittet af værdierne for de forskellige kolber, der stemte overens

— testtemperaturen

— analysemetoden

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

LITTERATUR:

(1) Bilag til Kommissionens direktiv 92/69/EØF af 31. juli 1992 om syttende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, EFT L 383 A af 29.12.1992, s. 54.

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

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

▼B

A.8. FORDELINGSKOEFFICIENT

1. METODE

Den beskrevne »rystekolbemetode« er baseret på OECD-testvejledningen (1).

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets strukturformel, dissociationskonstant, vandopløselighed, hydrolyse, opløselighed i n-octanol og overfladespænding.

Målinger på ioniserbare stoffer udføres på den ikke-ioniserede form (fri syre eller fri base) dvs. ved anvendelse af en passende buffer med en pH-værdi på mindst 1 enhed under (fri syre) eller over (fri base) stoffets pK-værdi.

Testmetoden omfatter to særskilte fremgangsmåder — rystekolbemetoden og højtydende væskekromatografi (HPLC). Førstnævnte er brugbar, når værdien af log Pow (se definitionerne nedenfor) ligger mellem — 2 og 4, og sidstnævnte i området mellem 0 og 6. Førend nogen af fremgangsmåderne påbegyndes, foretages der er foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten.

Rystekolbemetoden kan kun benyttes for stoffer, der i alt væsentligt er rene, og som er opløselige i vand og n-octanol. Den kan ikke anvendes til overfladeaktive materialer (for hvilke der anføres en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand).

HPLC-metoden kan ikke benyttes til stærke syrer og baser, metalkomplekser, overfladeaktive stoffer og stoffer, der reagerer med elueringsmidlet. For sådanne materialer anføres der en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand.

HPLC-metoden er mindre følsom end rystekolbemetoden over for urenheder i teststoffet. Ikke desto mindre kan urenheder i visse tilfælde vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne på grund af usikker tilforordning af toppene. For blandinger med et uopløst bånd anføres en øvre og nedre grænse for log P.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Fordelingkoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne (c_i) af et stof, der er opløst i et tofasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler. I tilfældet n-octanol og vand:

$$p_{ow} = \frac{c_n - \text{octanol}}{c_{vand}}$$

Fordelingskoefficienten (P) er derfor et forhold mellem to koncentrationer og opgives ofte som titalslogaritmen (log P).

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

Rystekolbemetoden

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

HPLC-metoden

For at kunne korrelere målte HPLC-data for et stof med dets P-værdi må der fastlægges en kalibreringskurve for log P mod kromatografiske data, som er baseret på mindst seks referencepunkter. Det er op til brugeren at vælge de egnede referencestoffer. Så vidt muligt skal der være mindst ét referencestof med en P_{ow}-værdi, der ligger over teststoffets, og mindst ét med en P_{ow}-værdi under teststoffets. For værdier af log P under 4 kan kalibreringen baseres på data opnået med rystekolbemetoden. For værdier af log P over 4 kan kalibreringen baseres på validerede litteraturværdier, hvis de stemmer overens med beregnede værdier. Af hensyn til nøjagtigheden anbefales at vælge referencestoffer, der strukturmæssigt ligner teststoffet.

Der foreligger omfattende lister med værdier for log P_{ow} for mange grupper af kemikalier (2)(3). Hvis der ikke foreligger data om fordelingskoefficienter for strukturmæssigt beslægtede stoffer, kan der bruges en mere generel kalibrering foretaget med andre referencestoffer.

Der er i tillæg 2 en liste over anbefalede referencestoffer og deres P_{ow}-værdier

1.4. METODENS PRINCIP

1.4.1. **Rystekolbemetoden**

For at kunne bestemme fordelingskoefficienten må der opnås ligevægt mellem alle komponenterne i systemet, og koncentrationerne af de i de to faser opløste stoffer må bestemmes. En gennemgang af litteraturen herom har vist, at der kan benyttes en række forskellige teknikker til at løse dette problem, dvs. omhyggelig blanding af de to faser og bestemmelse af ligevægtskoncentrationen af det undersøgte stof efter adskillelse af faserne.

1.4.2. **HPLC-metoden**

HPLC udføres på analytiske kolonner pakket med en kommercielt tilgængelig fast fase indeholdende lange kulbrintekæder (f.eks. C_8, C_{18}) kemisk bundet til silica. Indsprøjtes der kemikalier på en sådan kolonne, vil de vandre gennem den med forskellig hastighed, da deres fordeling mellem den mobile fase og den stationære kulbrintefase ikke er den samme. Kemikalieblandinger elueres i rækkefølge efter hydrofobicitet, idet de vandopløselige kemikalier elueres først og de olieopløselige sidst, alt efter deres kulbrinte/vand-fordelingskoefficient. Derved kan sammenhængen mellem retentionstiden på en sådan kolonne (med omvendt fase) og n-octanol/vand-fordelingskøfficienten fastslås. Fordelingskoefficienten udledes af kapacitetsfaktoren k, der er givet ved udtrykket:

▼B

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

hvor t_r er teststoffets retentionstid og t_o er den tid, et opløsningsmiddelmolekyle i gennemsnit bruger på at komme gennem kolonnen (kolonnens dødtid).

Der kræves ikke kvantitative analysemetoder, og det er kun nødvendigt at bestemme retentionstiderne.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

Rystekolbemetoden

For at opnå en tilstrækkeligt nøjagtig fordelingskoefficient foretages der dobbeltbestemmelse under tre forskellige testbetingelser, hvor både stofmængden og forholdet mellem opløsningsmidlerne kan varieres. De fundne værdier af fordelingskoefficienten skal, når de udtrykkes som titalslogaritmer, ligge inden for et interval på ± 0,3.

HPLC-metoden

For at øge tilliden til målingen foretages der dobbeltbestemmelse. Værdier af log P beregnet ud fra de enkelte målinger skal ligge inden for et interval på ± 0,1.

1.5.2. **Følsomhed**

Rystekolbemetoden

Metodens måleområde afgrænses af analysemetodens påvisningsgrænse. Den skal tillade bestemmelse af værdier for log P_{ow} i området fra 2 til 4 (under visse omstændigheder op til 5), når koncentrationen af opløst stof ikke er større end 0,01 mol pr. liter i nogen af faserne.

HPLC-metoden

Med HPLC-metoden kan der skønnes fordelingskoefficienter i log P_{ow}-området fra 0 til 6.

Normalt kan en forbindelses fordelingskoefficient skønnes med en afvigelse på mindre end ± 1 fra den værdi, der opnås med rystekolbemetoden. Typiske korrelationer fremgår af henvisning (4)(5)(6)(7)(8). Der kan normalt opnås større nøjagtighed, hvis der anvendes korrelationskurver bestemt med strukturmæssigt beslægtede referencestoffer (9).

▼B

1.5.3. **Specificitet**

Rystekolbemetoden

Nernsts fordelingslov gælder kun for fortyndede opløsninger ved konstant temperatur, tryk og pH. Den gælder kun for et enkelt stof, der er fordelt mellem to rene opløsningsmidler. Hvis der forekommer flere opløste stoffer i den ene eller i begge faser samtidig, kan dette påvirke resultaterne.

Dissociering eller associering af de opløste molekyler resulterer i afvigelser fra Nernsts fordelingslov. At fordelingskoefficienten afhænger af opløsningens koncentration er tegn på en sådan afvigelse.

På grund af de mange involverede ligevægte, må metoden ikke anvendes på ioniserbare stoffer uden korrektion. For sådanne stoffer kan det overvejes at benytte bufferopløsninger i stedet for vand; i så fald skal bufferens pH ligge mindst 1 enhed fra stoffets pKa, og dette pH's relevans for miljøet skal overvejes

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Indledende skøn over fordelingskoefficienten**

Der kan dannes et skøn over fordelingskoefficienten enten ved beregning (se tillæg 1), hvilket foretrækkes, eller i givet fald ud fra teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler (10).

1.6.2. **Rystekolbemetoden**

1.6.2.1. *Forberedelser*

n-octanol: bestemmelsen af fordelingskoefficienten udføres med reagenser af analysekvalitet.

vand: der anvendes vand, som er destilleret eller dobbeltdestilleret i glas- eller kvartsapparatur. Til ioniserbare forbindelser benyttes der bufferopløsninger i stedet for vand, hvis der er gode grunde hertil.

Bemærk:

Der må ikke bruges vand taget direkte fra en ionbytter.

1.6.2.1.1. Formætning af opløsningsmidlerne

Før en fordelingskoefficient bestemmes, mættes hver af de faser, der indgår i opløsningsmiddelsystemet, med den anden fase ved rystning ved forsøgstemperaturen. Hertil er det praktisk at ryste to store standflasker med henholdsvis n-octanol af analysekvalitet og vand med tilstrækkelig meget af det andet opløsningsmiddel på et mekanisk rysteapparat i 24 timer, og derefter lade dem henstå så længe, at faserne skiller og der er opnået mætning.

▼B

1.6.2.1.2. Forberedelse af testen

Testbeholderen skal være næsten helt fyldt af tofasesystemet. Derved hindres materialetab ved fordampning. Stofmængder og volumenforhold fastlægges på grundlag af:

— det foreløbige skøn over fordelingskoefficienten (se ovenfor)

— den mængde teststof, der mindst kræves til analysen

— en øvre koncentrationsgrænse på 0,01 mol/l for begge faser.

Der udføres tre test. I den første bruges det beregnede volumenforhold mellem n-octanol og vand; i den anden divideres dette forhold med 2, og i det tredje multipliceres det med 2 (f.eks. 1:1, 1:2 og 2:1).

1.6.2.1.3. Teststof

Der fremstilles en stamopløsning i n-octanol, der på forhånd er mættet med vand. Denne stamopløsnings koncentration bestemmes nøjagtigt, inden den anvendes til bestemmelse af fordelingskoefficienten. Den opbevares under betingelser, hvor den er stabil.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testtemperaturen skal holdes konstant (± 1 °C) og ligge mellem 20 og 25 °C.

1.6.2.3. *Fremgangsmåde ved målingen*

1.6.2.3.1. Opnåelse af fordelingsligevægt

For hver af testbetingelserne benyttes der to testbeholdere, der hver indeholder den nødvendige nøjagtigt afmålte mængde af de to opløsningsmidler og den nødvendige mængde stamopløsning.

n-octanolfaserne afmåles volumetrisk. Testbeholderne kan enten anbringes i et egnet rysteapparat eller rystes i hånden. Når et centrifugeglas benyttes, anbefales en hurtig 180° drejning om tværaksen af glasset, hvorved den indespærrede luft stiger op gennem de to faser. Erfaringen viser, at 50 sådanne drejninger normalt er tilstrækkeligt til, at fordelingsligevægten indtræder. For en sikkerheds skyld anbefales det at foretage 100 drejninger i løbet af 5 minutter.

1.6.2.3.2. Faseadskillelse

Blandingen kan om nødvendigt centrifugeres, så faserne adskilles. Det gøres i en laboratoriecentrifuge ved stuetemperatur; hvis der benyttes en centrifuge uden temperaturregulering, henstår centrifugeglassene i én time ved testtemperaturen til opnåelse af ligevægt før analyse.

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

Til bestemmelse af fordelingskoefficienten må koncentrationen af teststoffet i begge faser bestemmes. Det kan gøres ved, at der for hver testbetingelse udtages en delprøve af hver fase fra hvert glas, som analyseres ved den valgte metode. Den samlede mængde stof i begge faser beregnes og sammenlignes med den oprindeligt tilsatte stofmængde.

Prøven af vandfasen udtages på en sådan måde, at risikoen for, at den indeholder spor af n-octanol, bliver minimal, nemlig med en glasinjektionssprøjte. Fra starten skal sprøjten være delvis fyldt med luft, som langsomt trykkes ud, medens kanylen føres ned gennem n-octanollaget. En passende mængde af vandfasen suges op i sprøjten, som hurtigt trækkes op af opløsningen, og kanylen fjernes. Sprøjtens indhold kan nu benyttes som den vandige prøve. Koncentrationen i de to adskilte faser skal helst bestemmes ved en stofspecifik metode. Eksempelvis er følgende analysemetoder egnede:

— fotometriske metoder

— gaskromatografi

— højtydende væskekromatografi (HPLC).

1.6.3. **HPLC-metoden**

1.6.3.1. *Forberedelser*

Apparatur

Der kræves en væskekromatograf med pulsationsfri pumpe og passende detektionssystem. Det anbefales at bruge injektionsventil med injektionsspiral. Polære grupper i den stationære fase kan nedsætte HPLC-kolonnens ydeevne væsentligt. Derfor må stationære faser have det lavest mulige procentindhold af polære grupper (11). Der kan anvendes kommercielle mikroniserede pakkematerialer med omvendt fase eller færdigpakkede kolonner. Der kan eventuelt anbringes en beskyttelseskolonne mellem injektionssystemet og analysekolonnen.

Mobil fase

Der anvendes methanol og vand af HPLC-kvalitet til fremstilling af elueringsvæsken, som afgasses før brugen. Der benyttes isokratisk eluering. Den anvendte methanol/vand-blanding skal indeholde mindst 25 % vand. Til eluering af forbindelser med en log P på 6 på én time ved en flowhastighed på 1 ml/min vil en blanding af methanol og vand i forholdet 3:1 (v/v) typisk være tilfredsstillende. For forbindelser med en høj log P-værdi kan det være nødvendigt at nedsætte elueringstiden (også for referencestofferne) ved at benytte en mindre polær mobil fase eller en kortere kolonne.

Stoffer med meget lav opløselighed i n-octanol har tendens til at give unormalt lave værdier for log P_{ow} med HPLC-metoden; undertiden følger sådanne forbindelsers toppe opløsningsmiddelfronten. Dette skyldes sandsynligvis, at fordelingsprocessen er for langsom til, at der opnås ligevægt inden for den tid, en HPLC-adskillelse normalt tager. I så fald kan nedsættelse af flowhastigheden og/eller mindskelse af methanol/vand-forholdet være et virkningsfuldt middel til at opnå en pålidelig værdi.

▼B

Både teststof og referencestoffer skal være opløselige i den mobile fase i en så høj koncentration, at de kan påvises. Der må kun undtagelsesvis benyttes tilsætningsstoffer til methanol/vand-blandingen, da tilsætningsstoffer vil ændre kolonnens egenskaber. Til kromatogrammer med tilsætningsstoffer skal der altid anvendes en separat kolonne af samme type. Hvis methanol/vand ikke er egnet, kan der anvendes andre blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand.

For ioniserbare stoffer er elueringsvæskens pH kritisk. Det skal ligge inden for kolonnens driftsområde, som normalt er fra 2 til 8. Det anbefales at anvende buffer. Man må være omhyggelig med at undgå saltudfældning og ødelæggelse af kolonnen, hvilket kan forekomme med visse blandinger af organisk fase og buffer. Det tilrådes ikke at foretage HPLC-målinger med silicabaserede stationære faser med pH over 8, da alkalisk mobil fase kan føre til, at kolonnens ydeevne hurtigt falder.

Opløste stoffer

Referencestoffer skal være af renest mulige kvalitet. Til testnings- og kalibreringsformål opløses stofferne om muligt i den mobile fase.

Testningsbetingelser

Under målingen må temperaturen ikke variere med mere end ± 2 K.

1.6.3.2. **Måling**

Beregning af dødtiden t_o

Dødtiden t_o kan bestemmes enten med en homolog række (f.eks. n-alkylmethylketoner) eller med organiske stoffer, der ikke holdes tilbage (f.eks. thiourinstof eller formamid). Til beregning af dødtiden t_o ud fra en homolog række, indsprøjtes der mindst syv elementer af en homolog række, og retentionstiderne bestemmes. Bruttoretentionstiderne $t_{r\ (n\ c\ +\ 1)}$ afbildes mod $t_{r(n\ c),}$ og i regressionsligningen:

$$t_{r\ (n\ c\ +\ 1)} = a + b\ t_{r\ (n\ c)}$$

bestemmes afskæringen a og hældningskoefficienten b (n_c = antallet af kulstofatomer). Dødtiden er da givet ved:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Kalibreringskurve

Næste trin består i at konstruere en korrelationskurve af log k mod log P for passende referencestoffer. I praksis indsprøjtes der samtidig mellem fem og ti standardreferencestoffer, hvis log P ligger i det forventede område, og retentionstiderne bestemmes, helst med en integrationsskriver, der er koblet til detektionssystemet. De tilsvarende logaritmer til kapacitetsfaktorerne, log k, beregnes og afsættes mod den log P, der er bestemt ved rystekolbemetoden. Kalibreringen foretages regelmæssigt, mindst én gang dagligt, så der kan tages højde for eventuelle ændringer i kolonnens ydeevne.

Bestemmelse af teststoffets kapacitetsfaktor

Teststoffet indsprøjtes som en så lille mængde mobil fase som mulig. Retentionstiden bestemmes (dobbeltbestemmelse), hvorved kapacitetsfaktoren k kan beregnes. Ud fra korrelationskurven over referencestofferne kan teststoffets fordelingskoefficient interpoleres. Ved meget lave og meget høje fordelingskoefficienter er det nødvendigt at ekstrapolere. I sådanne tilfælde må man være særlig opmærksom på regressionslinjens konfidensgrænser.

2. **DATA**

Rystekolbemetoden

De målte P-værdiers pålidelighed kan kontrolleres ved sammenligning af gennemsnittet af dobbeltbestemmelserne med det samlede gennemsnit.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en beregnet værdi eller et skøn baseret på de enkelte opløseligheder, hvis metoderne ikke kan anvendes (f.eks. overfladeaktivt materiale)

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand.

For rystekolbemetoden:

— resultatet af et eventuelt indledende skøn

— den temperatur, som bestemmelsen er foretaget ved

— data om de analysemetoder, der er benyttet til koncentrationsbestemmelser

— eventuel centrifugeringstid og -hastighed

▼B

— målte koncentrationer i begge faser for hver bestemmelse (der skal således rapporteres i alt 12 koncentrationer)

— massen af teststof, det anvendte volumen af hver fase i hver testbeholder og den samlede beregnede mængde teststof i hver fase efter indstilling af ligevægt

— den beregnede værdi for fordelingskoefficienten (P) og gennemsnittet for hvert sæt testbetingelser samt gennemsnittet af samtlige bestemmelser. Eventuelle tegn på, at fordelingskoefficienten er koncentrationsafhængig anføres i rapporten

— de enkelte P-værdiers standardafvigelse fra gennemsnittet

— gennemsnitsværdien af P fra alle bestemmelser anføres tillige som titalslogaritmen

— den beregnede teoretiske værdi af P_{ow}, når denne værdi er bestemt eller når den målte værdi er $> 10^4$

— pH af det anvendte vand og af vandfasen under forsøget

— begrundelse for anvendelse af buffere i stedet for vand, deres sammensætning, koncentration og pH, samt vandfasens pH før og efter forsøget.

For HPLC-metoden:

— resultatet af et eventuelt foreløbigt skøn

— test- og referencestoffer og deres renhedsgrad

— det temperaturinterval, som bestemmelserne er foretaget ved

— det pH, som bestemmelserne er foretaget ved

— detaljerede oplysninger om analyse- og beskyttelseskolonne, mobil fase og detektionssystem

— retentionsdata og litteraturværdier for log P for referencestoffer benyttet ved kalibrering

— detaljerede oplysninger om den fittede regressionslinje (log k mod log P)

— gennemsnitlige retentionsdata og interpoleret log P-værdi for teststoffet

— beskrivelse af udstyr og driftsbetingelser

— elueringsprofiler

— den mængde test- og referencestof, der er indført i kolonnen

— dødtiden og hvordan den er målt.

▼B

4. **HENVISNINGER**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base1, 1978.

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

▼B

Tillæg 1

Metoder til beregning/estimering

INDLEDNING

I Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) er der en generel indføring i beregningsmetoder samt data og eksempler.

Beregnede værdier for P_{ow} kan benyttes:

— til at afgøre, hvilken forsøgsmetode der er mest velegnet (rystekolbemetoden: log P_{ow} — 2 til 4; HPLC-metoden: log P_{ow} 0 til 6)

— til at vælge de bedste forsøgsbetingelser (f.eks. referencestoffer til HPLC-metoden og volumenforholdet mellem n-octanol og vand til rystekolbemetoden)

— som intern laboratoriekontrol for eventuelle forsøgsfejl

— til at give et skøn over P_{ow} i de tilfælde, hvor man af tekniske årsager ikke kan anvende eksperimentelle metoder.

ESTIMERINGSMETODER

Foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten

Der kan foretages et skøn over værdien af fordelingskoefficienten ved hjælp af teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler: Hertil benyttes:

$$P_{estimate} = \frac{\text{saturation } c_{n-\text{ octanol}}}{\text{saturation } c_{water}}$$

BEREGNINGSMETODER

Princippet bag beregningsmetoderne

Alle beregningsmetoder er baseret på formel fragmentering af molekylet i passende delstrukturer, for hvilke man har pålideligt kendskab til log P_{ow}-bidrag. Log P_{ow} for hele molekylet beregnes dernæst som summen af fragmentværdierne plus summen af korrektionsudtryk for intramolekylære vekselvirkninger.

Der foreligger lister over fragmentkonstanter og korrektionsudtryk (b)(c)(d)(e). Nogle af dem ajourføres regelmæssigt (b).

Kvalitetskriterier

Sædvanligvis aftager beregningsmetodens pålidelighed med, at det undersøgte stofs kompleksitet stiger. For simple molekyler med lav molekylvægt og en eller to funktionelle grupper kan der forventes en afvigelse på 0,1 til 0,3 mellem resultatet af forskellige fragmenteringsmetoder og den målte værdi for log P_{ow}. Fejlmargenen kan være større for mere komplekse molekyler. Den afhænger af, om der foreligger fragmentkonstanter og hvor pålidelige de er, samt af, om intramolekylære vekselvirkninger (f.eks. hydrogenbindinger) erkendes, og om korrektionsudtrykkene anvendes korrekt (mindre problematisk med computerprogrammet CLOGP-3) (b). For ioniserbare forbindelsers vedkommende har det stor betydning, at ladningen eller ioniseringsgraden bedømmes korrekt.

▼B

Fremgangsmåde ved beregningen

Hanschs π-metode

Den oprindelige konstant for hydrofobe substituenter, π, som indførtes af Fujita m.fl. (f), defineres ved

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

hvor P_{ow} (PhX) er fordelingskoefficienten for et aromatisk derivat og P_{ow} (PhH) er stamforbindelsens fordelingskoefficient

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

Ifølge sin definition gælder π-metoden navnlig for aromatisk substitution. Der findes tabeller med π-værdier for en lang række substituenter (b)(c)(d). De benyttes til beregning af log P_{ow} for aromatiske molekyler og delstrukturer.

Rekkers metode

Efter Rekker (g) beregnes værdien af log P_{ow} således:

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

hvor f_i er de forskellige molekylfragmentkonstanter og a_i er den hyppighed, hvormed de forekommer i det pågældende molekyle. Korrektionsudtrykkene kan udtrykkes som et heltalsmultiplum af én enkelt konstant C_m (den såkaldte \char "BBmagiske konstant\char "AB). Fragmentkonstanterne f_i og C_m er bestemt på grundlag af en liste med 1054 eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} (825 forbindelser) ved hjælp af flerdimensional regressionsanalyse (c)(h). Vekselvirkningsudtrykkene bestemmes efter faste regler, der er beskrevet i henvisning (e)(h)(i).

Hansch-Leos metode

Efter Hansch og Leo (c) beregnes værdien af log P_{ow} således:

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

hvor f_i er de forskellige molekylfragmentkonstanter, F_j er korrektionsudtrykkene, og a_i, og b_j er de hertil hørende hyppigheder. Ud fra eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} har man ved at prøve sig frem kunnet opstille en liste over atom- og gruppefragmentværdier og en liste over korrektionsudtryk F_j (såkaldte »faktorer«). Korrektionsudtrykkene er ordnet i flere forskellige klasser (a)(c). Det er forholdsvis kompliceret og tidkrævende at tage hensyn til alle regler og korrektionsudtryk. Der er udviklet edb-programmer hertil (b).

Kombineret metode

Beregningen af log P_{ow} for komplekse molekyler kan forbedres betydeligt, hvis molekylet deles op i større delstrukturer, som man har pålidelige log P_{ow}-værdier for, enten fra tabeller (b)(c) eller fra egne målinger. Sådanne fragmenter (f.eks. heterocykliske forbindelser, anthraquinon, azobenzen) kan dernæst kombineres med Hanschs π-værdier eller Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Bemærkninger

i) Beregningsmetoderne kan kun anvendes på helt eller delvis ioniserede forbindelser, hvis de nødvendige korrektionsfaktorer kan tages i betragtning.

▼B

ii) Hvis der må antages at forekomme intramolekylære hydrogenbindinger, må det hertil svarende korrektionsudtryk (ca. + 0,6 til + 1,0 log P_{ow}-enheder) lægges til (a). Rumlige modeller og spektroskopiske data kan afsløre, om der kan være tale om sådanne bindinger i molekylet

iii) Hvis flere tautomere former er mulige, benyttes den mest sandsynlige form som grundlag for beregningen.

iv) Man skal nøje følge med i revisioner af lister over fragmentkonstanter.

Rapport

Ved anvendelse af beregningsmetoder skal testrapporten om muligt indeholde følgende oplysninger:

— beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af alle muligheder for intramolekylære hydrogenbindinger, dissociation, ladning eller andre særlige forhold (f.eks. tautomeri)

— beskrivelse af beregningsmetoden

— identifikation af de anvendte datas oprindelse

— særlige valg af fragmenter

— udtømmende dokumentation af beregningen.

HENVISNINGER

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Tillæg 2

Anbefalede referencestoffer til HPLC-metoden

nr.	referencestof	log_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	p-methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	phenoxyeddikesyre	1,4	pKa = 3,12
8	phenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	phenylacetonitril	1,6	
12	4-methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetophenon	1,7	
14	2-nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobenzoesyre	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	kanelalkohol	1,9	
19	benzoesyre	1,9	pKa = 4,19
20	p-cresol	1,9	pKa = 10,17
21	kanelsyre	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoat	2,1	
24	benzen	2,1	
25	3-methylbenzoesyre	2,4	pKa = 4,27
16	4-chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoat	2,6	
30	2,6-dichlorbenzonitril	2,6	
31	3-chlorbenzoesyre	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	1-naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allylphenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	

▼B

nr.	referencestof	log_{ow}	pKa
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzophenon	3,2	
40	4-phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4-dichlorbenzen	3,4	
43	diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	naphthalen	3,6	
45	phenylbenzoat	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6-trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	biphenyl	4,0	
49	benzylbenzoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	1,2,4-trichlorbenzen	4,2	
52	dodecansyre	4,2	
53	diphenylether	4,2	
54	n-butylbenzen	4,5	
55	phenanthren	4,5	
56	fluoranthen	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-diphenylpyridin	4,9	
59	triphenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Andre referencestoffer med lav log P_{ow}		
1	nikotinsyre	- 0,07	

▼B

A.9. **FLAMMEPUNKT**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets brændbarhed. Metoden kan anvendes for væsker, hvis dampe kan antændes af en antændelseskilde. De opregnede testmetoder er kun pålidelige i de flammepunktsintervaller, der er anført ved de enkelte metoder.

Ved valg af metode skal det tages med i overvejelserne, om der kan ske en kemisk reaktion mellem stoffet og testbeholderen.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Flammepunktet er den laveste temperatur, korrigeret til et tryk på 101,325 kPa, ved hvilken en væske under de i metoden fastsatte betingelser udvikler dampe i en sådan mængde, at de danner en brændbar blanding med luft i testbeholderen.

Enheder: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

(t er i ^{o}C og T er i K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en testbeholder og opvarmes eller afkøles til testtemperaturen efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i den enkelte testmetode. Der udføres antændelsesforsøg til konstatering af, om prøven antændes ved testtemperaturen eller ikke.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

Repeterbarheden varierer alt efter flammepunktsområdet og den anvendte metode; højst 2 ^{o}C.

1.5.2. **Følsomhed**

Følsomheden afhænger af den anvendte testmetode.

1.5.3. **Specificitet**

Nogle af testmetoderne er begrænset til et bestemt flammepunktsinterval, og deres specificitet afhænger af andre stofegenskaber (f.eks. høj viskositet).

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Der anbringes en prøve af stoffet i testapparatet efter 1.6.3.1 og/eller 1.6.3.2.

Af sikkerhedshensyn anbefales det, at der kun anvendes en lille test, dvs. ca. 2 cm^3, af energirige og giftige stoffer.

1.6.2. **Testbetingelser**

For så vidt som det er foreneligt med sikkerhedskravene, skal apparatet anbringes et trækfrit sted.

1.6.3. **Udførelse af testen**

1.6.3.1. *Ligevægtsmetoden*

Se ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 og ISO 3679.

1.6.3.2. *Ikke-ligevægtsmetoden*

Abel apparat:

Se BS 2000 part 170, NF M07-011 og NF T66-009.

Abel-Pensky apparat:

Se EN 57, DIN 51755 part 1 (for temperaturer fra 5 °C til 65 °C), DIN 51755 part 2 (for temperaturer under 5 °C) og NF M07-036.

Tag apparat:

Se ASTM D 56.

Pensky-Martens apparat:

See ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 og NF M07-019.

Bemærkninger:

Hvis der ved en ikke-ligevægtsmetode i 1.6.3.2 findes et flammepunkt på 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C eller 55 ± 2 °C, skal det bekræftes ved en ligevægtsmetode med samme apparat.

Til anmeldelsesformål kan der kun bruges metoder, der giver flammepunktstemperaturen.

Til bestemmelse af flammepunktet af tyktflydende opløsningsmiddelholdige væsker (maling, lim og lignende) må der kun benyttes apparater og testmetoder, der er egnede til bestemmelse af tyktflydende væskers flammepunkt.

Se ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 og DIN 53213 part 1.

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af den anvendte metode samt eventuelle afvigelser herfra

— resultaterne og supplerende bemærkninger af betydning for vurdering af dem.

4. **HENVISNINGER**

Ingen.

▼B

A.10. **ANTÆNDELIGHED (FASTE STOFFER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Testen udføres kun på stoffer, der foreligger som pulver, granulat eller pasta.

For ikke at medtage alle stoffer, der kan antændes, men kun dem, der brænder hurtigt eller på en måde, der er særlig farlig, anses kun de stoffer, hvis forbrændingshastighed overstiger en vis værdi, for at være let antændelige.

Det kan være særlig farligt, hvis forglødning kan fortsætte gennem metalpulver, da en brand er vanskelig at slukke. Metalpulver, hvori forglødningen kan udbrede sig i et bestemt tidsrum, anses for let antændelige.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Forbrændingstiden udtrykkes i sekunder.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en ca. 250 mm lang ubrudt stribe, og der foretages en indledende screeningstest til bestemmelse af, om der efter antænding med en gasflamme sker en forbrænding, der breder sig med åben flamme eller ved glødning. Hvis forbrændingen breder sig mere end 200 mm hen ad striben i løbet af et bestemt tidsrum, udføres der et komplet testprogram til bestemmelse af forbrændingshastigheden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen anført.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Indledende screeningprøve**

Stoffet anbringes på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en ca. 250 mm lang, 20 mm bred og 10 mm høj ubrudt stribe. En gasflamme (mindste diameter 5 mm) holdes hen til den ene ende af striben, indtil pulveret bryder i brand, dog højst 2 minutter (5 minutter for pulver af metal og metallegeringer). Det noteres, om forbrændingen breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperioden på 4 minutter (40 minutter for metalpulver). Hvis stoffet ikke bryder i brand eller forbrændingen ikke med åben flamme eller ved glødning breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperiodens 4 minutter (40 minutter), anses stoffet ikke for at være let antændeligt, og yderligere testning er ikke påkrævet. Hvis forbrændingen i stoffet breder sig 200 mm hen ad striben på mindre end 4 minutter eller mindre end 40 for metalpulver, gennemføres nedenstående test (1.6.2).

1.6.2. **Test af forbrændingshastigheden**

1.6.2.1. *Forberedelse*

Stoffer, der foreligger som pulver eller granulat, fyldes løst i en 250 mm lang form, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Derefter lader man tre gange formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde. Om nødvendigt fyldes formen op igen. Sidestykkerne fjernes, og overskydende materiale skrabes af. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Pasta-agtige stoffer bredes ud på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en 250 mm lang pølse med et tværsnit på ca. 1 cm^2.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Er stoffet følsomt over for fugt, gennemføres testen så hurtigt som muligt efter, at stoffet er taget ud af beholderen.

1.6.2.3. *Udførelse af prøvningen*

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under prøvningen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Volden antændes i den ene ende med en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Når forbrændingen har forplantet sig 80 mm, måles udbredelseshastigheden over de næste 100 mm.

▼B

Testen udføres seks gange, hver gang med en ren kold plade, medmindre der observeres et positivt resultat tidligere.

2. **DATA**

Forbrændingstiden fra den indledende screeningstest (1.6.1) og den korteste forbrændingstid i op til seks test (1.6.2.3) er relevante for vurderingen.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en nøjagtig beskrivelse af det testede stof, dets fysiske tilstandsform og dets fugtindhold

— resultaterne af den indledende screeningstest og af testen af forbrændingshastigheden, hvis den er udført

— alle yderligere bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Stoffer, der foreligger i form af pulver, granulat eller pasta, anses for at være let antændelige, hvis forbrændingstiden i nogen af de test, der er udført efter 1.6.2, er mindre end 45 sekunder. Pulver af metal eller en metallegering anses for at være let antændeligt, hvis det kan antændes og flammen eller reaktionszonen forplanter sig over hele testen på 10 minutter eller derunder.

4. **HENVISNINGER**

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

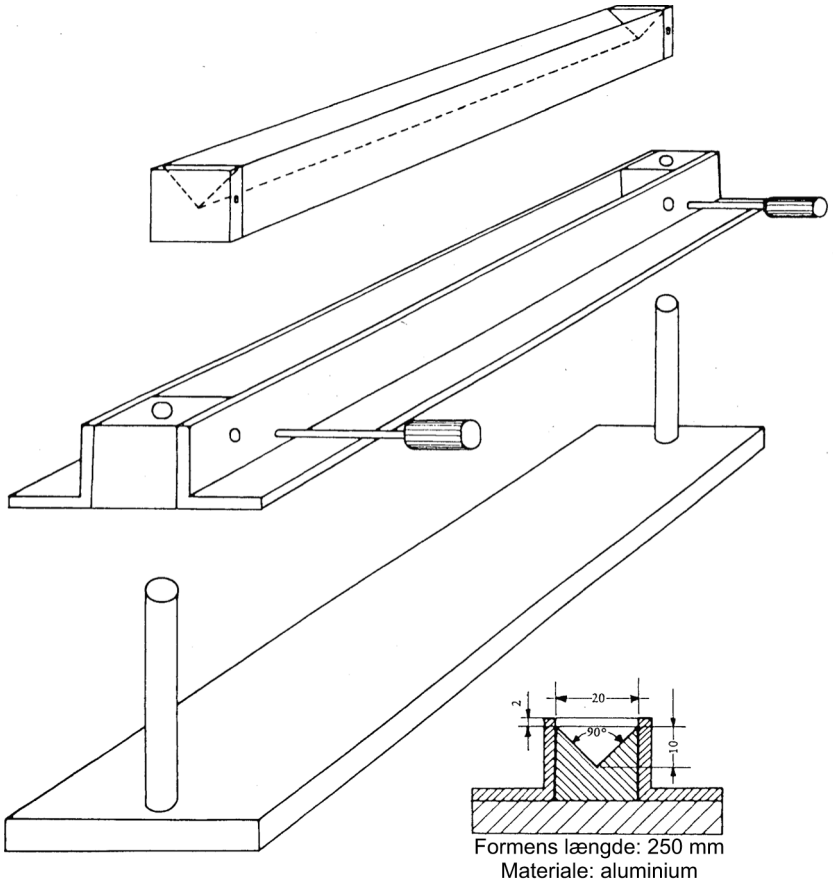
▼B

Tillæg

Figur

Form og tilbehor til fremstilling af volden

(alle mal i millimeter)



▼B

A.11. **ANTÆNDELIGHED (GASSER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Med denne metode kan det bestemmes, om en gas blandet med luft ved stuetemperatur (ca. 20 °C) og atmosfæretryk kan antændes, og i så fald i hvilket koncentrationsområde. Blandinger med stigende koncentrationer af prøvegassen med luft påvirkes med en elektrisk gnist, og det iagttages, om der sker antændelse.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Området for antændelighed er koncentrationsområdet mellem den nedre og den øvre eksplosionsgrænse. Nedre og øvre eksplosionsgrænse er de koncentrationsgrænser for den antændelige gas i blanding med luft, ved hvilke der ikke sker nogen flammeudbredelse.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Koncentrationen af gassen i luft øges trinvis, og blandingen påvirkes ved hvert trin med en elektrisk gnist.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

Testbeholderen er en opretstående glascylinder med en indre diameter på mindst 50 mm og en højde på mindst 300 mm. Antændelseselektroderne er placeret 60 mm over cylinderens bund med en indbyrdes afstand på 3 til 5 mm. Cylinderen er forsynet med en trykaflastningsåbning. Apparatet skal afskærmes, så eventuelle eksplosionsskader begrænses.

Som antændelseskilde anvendes en stående induktionsgnist med en varighed på 0,5 sek. Den dannes af en højspændingstransformator med en sekundærspænding på 10 til 15 kV (største tilførte effekt 300 W). I henvisning (2) er der vist et eksempel på et egnet apparat.

1.6.2. **Testbetingelser**

Testen skal udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

▼B

1.6.3. **Udførelse af testen**

Ved hjælp af doseringspumper ledes en gas/luftblanding med kendt koncentration ind i glascylinderen. Blandingen påvirkes med en gnistudladning, og det iagttages, om der ved antændelseskilden opstår en flamme, som forplanter sig af sig selv. Gaskoncentrationen varieres i intervaller på 1 vol. %, indtil der sker antændelse som beskrevet ovenfor.

Hvis det ud fra kendskab til gassens kemiske struktur må formodes, at gassen ikke kan antændes, og sammensætningen af den støkiometriske blanding med luft kan beregnes, behøver man kun at afprøve blandinger fra 10 % under til 10 % over det støkiometriske blandingsforhold.

2. **DATA**

Den eneste information, der er relevant for bestemmelse af denne egenskab, er, om der forekommer flammeudbredelse.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— beskrivelse af det anvendte apparat med angivelse af dimensioner

— den temperatur, som testen er udført ved

— de afprøvede koncentrationer og de opnåede resultater

— testens resultat: ikke-antændelig eller let antændelig gas

— konkluderes det, at gassen er ikke-antændelig, anføres det koncentrationsområde, hvor prøvning med 1 % intervaller har fundet sted

— alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

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

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

▼B

A.12. **ANTÆNDELIGHED (KONTAKT MED VAND)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Denne testmetode kan anvendes til bestemmelse af, om et stof ved reaktion med vand udvikler farlige mængder gas, der eventuelt er let antændelig.

Testmetoden kan anvendes til både væsker og faste stoffer. Den kan ikke anvendes til stoffer, der spontant bryder i brand, når de kommer i kontakt med luften.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Let antændelig: stoffer, som ved kontakt med vand eller fugtig luft udvikler let antændelige gasser i farlige mængder, dvs. mindst 1 liter/kg pr. time.

1.3. METODENS PRINCIP

Testen foregår trinvis som beskrevet nedenfor; testen kan afbrydes, når der sker antænding. Hvis det vides, at stoffet ikke reagerer voldsomt med vand, kan man begynde med trin 4 (1.3.4).

1.3.1. **Trin 1**

Teststoffet anbringes i et kar med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.2. **Trin 2**

Teststoffet anbringes på et stykke filtrerpapir, der flyder på overfladen i en skål med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand. Filtrerpapiret tjener udelukkende til at holde stoffet samlet på ét sted for at øge chancerne for antændelse.

1.3.3. **Trin 3**

Teststoffet arrangeres i en ca. 2 cm høj bunke med en diameter på ca. 3 cm. Der tilsættes et par dråber vand til bunken, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.4. **Trin 4**

Teststoffet blandes med destilleret vand ved 20 °C, og gasudviklingens hastighed måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis hastigheden efter 7 timer er uregelmæssig eller stigende, forlænges måleperioden, dog højst til 5 dage. Testen kan afbrydes, hvis hastigheden på noget tidspunkt overstiger 1 liter/kg pr. time.

▼B

1.4. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Trin 1**

1.6.1.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.1.2. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm i diameter) anbringes i et kar med destilleret vand. Det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.2. **Trin 2**

1.6.2.1. *Apparatur*

Et stykke filtrerpapir anbringes fladt flydende på overfladen af destilleret vand i en egnet beholder, f.eks. en afdampningsskål med en diameter på 100 mm.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm diameter) anbringes midt på filtrerpapiret. Det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.3. **Trin 3**

1.6.3.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.3.2. *Udførelse af testen*

Teststoffet anbringes i en ca. 2 cm høj bunke på ca. 3 cm i diameter med en fordybning i toppen. Der anbringes et par dråber vand i fordybningen, og det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

▼B

1.6.4. **Trin 4**

1.6.4.1. *Apparatur*

Der anvendes et apparat som vist på figuren.

1.6.4.2. *Testbetingelser*

Det undersøges visuelt, om beholderen med teststof indeholder pulver på under 500 μm (partikelstørrelse). Hvis pulver udgør mere end 1 % (w/w) af den samlede prøve eller prøven er smuldrende, formales hele testen til pulver inden testen, så der tages hensyn til reduktion af partikelstørrelsen under opbevaring og håndtering; i alle andre tilfælde undersøges testen i den stand, hvori den er modtaget. Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 ^{o}C) og atmosfæretryk.

1.6.4.3. *Udførelse af testen*

Der anbringes 10-20 ml vand i apparatets tildrypningstragt og 10 g stof i den koniske kolbe. Den udviklede gasmængde kan måles ved enhver egnet metode. Tildrypningstragtens hane åbnes, så vandet løber ned i kolben, og et stopur startes. Gasudviklingen måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis gasudviklingen er uregelmæssig i denne periode eller stiger hen mod periodens slutning, fortsættes målingerne i op til 5 døgn. Hvis gasudviklingen på noget tidspunkt kommer over 1 liter/kg pr. time, kan testen afbrydes. Testen gentages yderligere to gange.

Hvis gassens kemiske sammensætning ikke er kendt, foretages der en analyse af den. Hvis gassen indeholder let antændelige bestanddele, og det ikke vides, om hele blandingen er let antændelig, fremstilles der en blanding med samme sammensætning, som test efter metode A.11.

2. **DATA**

Stoffet anses for farligt, hvis

— det spontant bryder i brand på noget trin af testen

eller

— der udvikles brændbar gas i større mængde end 1 liter/kg pr. time.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— eventuel forbehandling af teststoffet

▼B

— resultatet af testen (trin 1, 2, 3 og 4)

— den udviklede gas' kemiske sammensætning

— gasudviklingshastigheden, hvis trin 4 (1.6.4) udføres

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

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

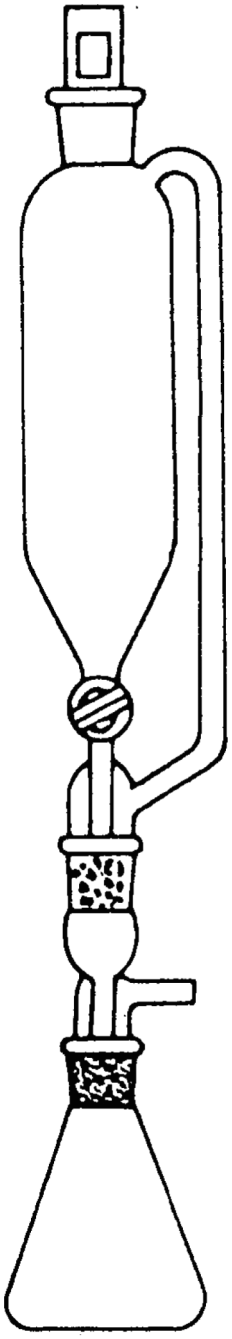
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Tillæg

Figur

Apparatur



▼B

A.13 **VÆSKERS OG FASTE STOFFERS PYROFORISKE EGENSKABER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Testmetoden kan anvendes for væsker og faste stoffer, der i små mængder spontant bryder i brand kort tid efter at være kommet i kontakt med luften ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Stoffer, der skal udsættes for luftens påvirkning i flere dage eller timer ved stuetemperatur, førend der sker antændelse, omfattes ikke af denne testmetode.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Stoffer anses for at være selvantændelige, hvis de bryder i brand eller forkuller under betingelserne i 1.6.

Det kan også være påkrævet at undersøge væskers selvantændelse med metode A.15 Selvantændelsestemperatur (væsker og gasser).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet, fast eller flydende, blandes med en inaktiv bærer og bringes i kontakt med luften ved stuetemperatur i 5 minutter. Væsker, der ikke bryder i brand, absorberes dernæst på filtrerpapir og udsættes for luftens påvirkning ved omgivende temperatur (ca. 20 °C) i 5 minutter. Flydende og faste stoffer, der bryder i brand, og væsker, der bryder i brand eller får filtrerpapiret til at forkulle, anses for at være selvantændelige.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarhed: på grund af den sikkerhedsmæssige betydning er et enkelt positivt resultat tilstrækkeligt til, at stoffet anses for selvantændeligt.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Der fyldes et ca. 5 mm tykt lag diatoméjord i en porcelænsskål med en diameter på ca. 10 cm ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Bemærk:

Diatoméjord eller et andet tilsvarende inaktivt stof, som er let at få fat i, antages at repræsentere den jord, som teststoffet kunne blive spildt på i tilfælde af uheld.

Der behøves tørt filtrerpapir til test af væsker, som ikke bryder i brand ved kontakt med luften, når de er blandet med et inaktivt bæremateriale.

▼B

1.6.2. **Udførelse af testen**

a) *Faste stoffer i pulverform*

Fra en højde af ca. 1 m hældes 1-2 cm^3 af pulveret ned på en ikke-brændbar flade, og det iagttages, om stoffet bryder i brand under faldet eller inden for 5 minutter derefter.

Testen udføres seks gange, medmindre der sker antændelse.

b) *Væsker*

Ca. 5 cm^3 af testvæsken hældes ud i den klargjorte porcelænsskål, og det iagttages, om stoffet bryder i brand, inden der er gået 5 minutter.

Hvis der ikke sker antændelse i nogen af de seks forsøg, udføres følgende forsøg:

Med en injektionssprøjte sprøjtes 0,5 ml af prøven ud på et bøjet stykke filtrerpapir, og det iagttages, om der inden for 5 minutter sker antændelse eller forkulning af filtrerpapiret. Forsøget udføres 3 gange, medmindre der sker antændelse eller forkulning.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Testen kan afbrydes, så snart et af forsøgene giver positivt resultat.

2.2. EVALUERING

Hvis stoffet bryder i brand inden 5 minutter efter, at det er tilsat til en inaktiv bærer og blevet udsat for luftens påvirkning, eller hvis en væske får et stykke filtrerpapir til at forkulle eller bryde i brand, inden 5 minutter efter at stoffet er tilsat og blevet udsat for luftens påvirkning, anses stoffet (væsken) for at være selvantændeligt.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— resultaterne af testen

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

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

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

▼B

A.14. **EKSPLOSIVE EGENSKABER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Metoden indeholder et testsystem til bestemmelse af, om et fast eller pastaagtigt stof frembyder eksplosionsfare, når det udsættes for påvirkning med en flamme (varmefølsomhed) eller ved slag eller friktion (følsomhed over for mekanisk påvirkning), og om en væske frembyder eksplosionsfare, når den udsættes for påvirkning med en flamme eller ved slag.

Metoden består af tre dele:

a) en test for varmefølsomhed (1)

b) en test for følsomhed over for slagpåvirkning (1)

c) en test for følsomhed over for friktionspåvirkning (1).

Metoden giver data til vurdering af sandsynligheden for, at der ved visse almindelige påvirkninger fremkaldes en eksplosion. Metoden tilsigter ikke at fastslå, om stoffet overhovedet kan bringes til at eksplodere.

Metoden er egnet til bestemmelse af, om et stof frembyder en eksplosionfare (varmefølsomhed og mekanisk følsomhed) under de særlige betingelser, der er specificeret i direktivet. Metoden er baseret på en række apparattyper, som i vidt omfang anvendes internationalt (1), og som sædvanligvis giver brugbare resultater. Det erkendes, at metoden ikke er definitiv. Der kan benyttes andet apparatur end det specificerede, forudsat at det er internationalt anerkendt, og at de fundne resultater kan korreleres til resultater opnået med det specificerede apparatur.

Testen behøver ikke at udføres, hvis det på grundlag af foreliggende termodynamiske oplysninger (f.eks. dannelsesvarme eller dekomponeringsvarme) og/eller en strukturformel, hvori visse reaktive grupper (2) ikke indgår, må anses for hævet over enhver rimelig tvivl, at stoffet er ude af stand til hurtig dekomponering ledsaget af gasudvikling eller varmefrigørelse (dvs. at stoffet ikke frembyder nogen eksplosionsfare). For væsker kræves der ikke test for friktionsfølsomhed.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Eksplosiv:

Stoffer, som kan eksplodere ved flammepåvirkning, eller som er følsomme over for slag eller friktion (eller mere følsomme over for mekanisk påvirkning end 1,3-dinitrobenzen i et alternativt apparat).

1.3. REFERENCESTOFFER

1,3-dinitrobenzen, teknisk krystallinsk produkt, sigtet på 0,5 mm sigte, til friktions- og slagpåvirkningsmetoden.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogen, cyclonite — CAS 121-82-4), omkrystalliseret i vandig cyclohexanon, vådsigtet på 250 μm sigte og tilbageholdt på en 150 μm sigte, tørret ved 103 ± 2 ^{o}C (i 4 timer) til anden række friktions- og slagprøvninger.

▼B

1.4. METODENS PRINCIP

Der kræves indledende testning til bestemmelse af, hvordan de tre følsomhedstest kan udføres under betryggende forhold.

1.4.1. **Test for sikker håndtering (3)**

Af sikkerhedshensyn foretages der før den egentlige test en indledende test bestående i, at en meget lille testmængde (ca. 10 mg) opvarmes fritliggende i en gasflamme, og påvirkes med slag i et passende apparat og ved friktion ved hjælp af en hammer mod en ambolt eller et andet friktionsapparat. Formålet er at fastslå, om stoffet er så følsomt og eksplosivt, at den foreskrevne følsomhedstest, især for varmefølsomhed, må udføres under iagttagelse af særlige forholdsregler, så operatøren ikke kan komme til skade.

1.4.2. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

Metoden består i opvarmning af stoffet i et stålrør, der er lukket med en mundingsplade. Ved hjælp af mundingsplader med forskellige huldiametre kan det bestemmes, om stoffet er tilbøjeligt til at eksplodere under stærk varmepåvirkning og veldefineret indeslutningsgrad.

1.4.3. **Mekanisk følsomhed (slag)**

Metoden består i, at stoffet udsættes for et slag med et specificeret lod, der falder fra en specificeret højde.

1.4.4. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

Metoden består i, at et fast eller pastaagtigt stof udsættes for friktion mellem standardoverflader med specificeret belastning og ved specificeret relativ bevægelse.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

1.6.1.1. *Apparatur*

Apparaturet består af et engangsstålrør med lukkeanordning (figur 1) anbragt i en opvarmnings- og beskyttelsesanordning. Røret er af dybtrukket stålplade (se tillægget) og har en indvendig diameter på 24 mm, en længde på 75 mm og en godstykkelse på 0,5 mm. Røret har i den åbne ende en flange, så det kan lukkes med mundingspladen ved hjælp af en todelt forskruning (møtrik og krave med gevind). Mundingspladen er trykmodstandsdygtig og har et hul i midten. Møtrikken og kraven med gevind er fremstillet i chrom-manganstål (se tillægget), som er gnistfrit op til 800 °C. Der foreligger mundingsplader med en række forskellige huldiametre, som er fremstillet i 6 mm tykt varmebestandigt stål (se tillægget).

▼B

1.6.1.2. *Testbetingelser*

Normalt testes stoffet i den tilstand, hvori det er modtaget, men i visse tilfælde, f.eks. hvis det foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, kan det være nødvendigt at knuse stoffet før testen.

For faste stoffer bestemmes den mængde materiale, der skal anvendes til testen, ved en to-trins procedure. Først fyldes der i et tareret rør 9 cm^3 af stoffer, som nedstampes med en kraft på 80 N fordelt over hele rørtværsnittet. Af sikkerhedshensyn eller i tilfælde, hvor stoffet kan ændre fysisk form ved kompression, kan der benyttes andre påfyldningsmetoder; eksempelvis er stampning ikke egnet, hvis stoffet er meget friktionsfølsomt. Hvis materialet kan komprimeres, tilsættes der mere og stampes, indtil røret er fyldt til en højde af 55 mm fra overkanten. Den samlede mængde, der er brugt til fyldning af røret til denne højde, bestemmes, og der tilsættes endnu 2 portioner, som stampes med en kraft på 80 N. Der tilsættes materiale med stampning eller fjernes materiale, så røret er fyldt til 15 mm fra overkanten. Det andet trin foregår ved, at der først tilsættes og stampes en tredjedel af den samlede mængde, der blev brugt til det første trin. Der tilsættes endnu 2 portioner med stampning med 80 N, og materialets højde i røret justeres til 15 mm fra overkanten ved tilsætning eller fjernelse af materiale. Til hvert forsøg anvendes den mængde fast stof, der er fundet ved dette andet trin; påfyldningen sker i 3 lige store portioner, der hver komprimeres til 9 cm^3 med den fornødne kraft. (Dette gøres lettest ved anvendelse af afstandsringe).

Væsker og geler fyldes i røret til en højde af 60 mm, idet det for gelernes vedkommende nøje påses, at der ikke dannes luftbobler. Kraven med gevind føres op om røret nedefra, den valgte mundingsplade indsættes, og møtrikken strammes efter smøring med et molybdænsulfidbaseret smøremiddel. Det er yderst vigtigt at kontrollere, at der hverken har sat sig stof mellem flangen og pladen eller i gevindet.

Opvarmningen sker med propan, der fra en industriel trykflaske med trykregulator (60-70 mbar) ledes gennem en måler og fordeles ligeligt til 4 brændere gennem en manifold (hvilket kontrolleres ved visuel inspektion af brændernes flammer). Brænderne er placeret omkring prøvekammeret som vist på figur 1. De 4 brænderes samlede forbrug er på ca. 3,2 liter propan pr. minut. Der kan anvendes andre brændstoffer og brændere, men opvarmningshastigheden skal være som specificeret i figur 3. Uanset det anvendte apparatur skal opvarmningshastigheden regelmæssigt kontrolleres med dibutylphthalatfyldte rør, som vist på figur 3.

1.6.1.3. *Udførelse af testene*

Hver test varer, indtil røret enten sønderdeles eller røret har været opvarmet i 5 minutter. En test, hvorved røret sønderdeles i tre eller flere fragmenter, som eventuelt hænger sammen med smalle metalstrimler som vist på figur 2, vurderes som en eksplosion. En test, der fører til færre fragmenter eller ingen fragmentering, betragtes ikke som en eksplosion.

▼B

Der udføres først tre test med en mundingsplade med et 6,0 mm hul, og opnås der ingen eksplosion, udføres endnu tre test med en mundingsplade med et 2,0 mm hul. Finder der eksplosion sted under én af disse forsøgsrækker, er yderligere testning ikke påkrævet.

1.6.1.4. *Evaluering*

Testens resultat anses for positivt, hvis der sker eksplosion i én af ovennævnte forsøgsrækker.

1.6.2. **Mekanisk følsomhed (slag)**

1.6.2.1. *Apparatur (figur 4)*

Hoveddelene af et typisk faldhammerapparat er en støbt stålblok med bundplade, ambolt, stander, styr, faldlodder, frigørelsesmekanisme og prøveholder. Stålambolten på 100 mm (diameter) × 70 mm (højde) er skruet fast oven på en stålblok på 230 mm (længde) × 250 mm (bredde) × 200 mm (højde) med støbt bundplade på 450 mm (længde) × 450 mm (bredde) × 60 mm (højde). En stander bestående af et sømløst trukket stålrør er fastgjort i en holder, der er fastskruet bag på stålblokken. Apparatet er forankret til en massiv betonklods på 60 × 60 × 60 cm med fire skruer, så styrene er fuldstændig lodrette og faldlodderne kan falde frit. Der findes lodder på 5 og 10 kg fremstillet i massivt stål. Loddernes slaghoved er af hærdet stål, HRC 60 til 63, og har en diameter på mindst 25 mm.

Testen er indeholdt i en slaganordning bestående af to massive stålcylindre anbragt koaksialt over hinanden i en hul cylindrisk styrering af stål. Stålcylindrene skal have en diameter på 10 (- 0,003, - 0,005) mm og en højde på 10 mm og have polerede endeflader, afrundede kanter (krumningsradius 0,5 mm) og en hårdhed på HRC 58 til 65. Den hule cylinder skal have en udvendig diameter på 16 mm, en poleret udboring på 10 (+ 0,005, + 0,010) mm og en højde på 13 mm. Slaganordningen samles på en mellemambolt (diameter 26 mm, højde 26 mm) af stål og centreres med en ring, hvori der er huller til bortledning af eksplosionsprodukterne.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testvolumenet skal være på 40 mm^3 eller det volumen, der passer til et alternativt apparat. Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen fra 0,5 mm til 1 mm diameter bruges til testen og skal være repræsentativ for det oprindelige stof.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand og under alle omstændigheder efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel. Ved test af væsker er der en afstand på 1 mm mellem den øverste og den nederste stålcylinder.

▼B

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

Der udføres seks forsøg, hvor 10 kg's loddet falder fra en højde af 0,40 m (40 J). Forekommer der eksplosion i et af de 6 forsøg med 40 J, udføres der en ny række på seks forsøg, hvor et 5 kg's lod falder fra en højde af 0,15 m (7,5 J). I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.2.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (opflamning og knald betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede slagapparat, eller hvis prøven er mere følsom end 1,3-dinitrobenzen eller RDX i en alternativ slagtest.

1.6.3. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

1.6.3.1. *Apparatur (figur 5)*

Friktionsapparatet består af en støbt bundplade af stål, hvorpå friktionsanordningen er monteret. Den består af en fastsiddende porcelænsstift og en bevægelig porcelænsplade. Porcelænspladen fastholdes i en slæde, der glider på to styr. Slæden er via en forbindelsesstang, en krumtap og et passende gear forbundet med en elmotor, således at porcelænspladen bevæges 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften én gang. Porcelænsstiften kan belastes f.eks. med 120 eller 360 newton.

Porcelænspladerne er flade og er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn (ruhed 9 til 32 μm) og har dimensionerne 25 mm (længde) × 25 mm (bredde) × 5 mm (højde). Den cylindriske porcelænsstift, der ligeledes er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn, har en længde på 15 mm, en diameter på 10 mm og ru kugleformede endeflader med en krumningsradius på 10 mm.

1.6.3.2. *Testbetingelser*

Prøvevolumenet skal være på 10 mm^3 eller det volumen, der passer til et alternativt apparat.

Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således:

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen < 0,5 mm diameter bruges til testen.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand. Hvis stoffet ikke kan tørres, skal pastaen (efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel) testes som et 0,5 mm tykt lag med en bredde på 2 mm og en længde på 10 mm, der udlægges med en skabelon.

▼B

1.6.3.3. *Udførelse af testen*

Porcelænsstiften anbringes på prøven, og belastningen påsættes. Ved udførelse af testen skal skuremærkerne på porcelænspladen vende på tværs af bevægelsesretningen. Det må nøje påses, at der er tilstrækkeligt testmateriale under stiften, og at pladen bevæger sig korrekt under stiften. Til anbringelse af pastaagtige stoffer på pladen anvendes der en 0,5 mm tyk skabelon med et åbent felt på 2 × 10 mm. Porcelænspladen skal bevæge sig 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften i løbet af 0,44 sekunder. Hver del af porcelænspladen og -stiften må kun bruges én gang; de to ender af en stift kan bruges til to forsøg og de to flader af en plade kan hver bruges til tre forsøg.

Der udføres seks forsøg med en belastning på 360 N. Forekommer der eksplosion i et af disse seks forsøg, udføres der en ny række på seks forsøg med en belastning på 120 N. I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.3.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (knitren og/eller knald eller opflamning betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede friktionsapparat, eller hvis de tilsvarende kriterier i en alternativ friktionstest er opfyldt.

2. **DATA**

Principielt anses et stof for at være eksplosionsfarligt i direktivets forstand, hvis der ved testen for varme-, slag- eller friktionsfølsomhed opnås et positivt resultat.

3. **RAPPORTERING**

3.1. PRØVNINGSRAPPORTEN

Prøvningsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— teststoffets betegnelse, sammensætning, renhed, fugtindhold mv.

— prøvens fysiske tilstandsform samt oplysning om, om den er knust, findelt og/eller sigtet

— iagttagelser under testen for varmefølsomhed (f.eks. testmasse, antal fragmenter mv.)

— iagttagelser under testen for mekanisk følsomhed (f.eks. dannelse af væsentlige røgmængder eller fuldstændig dekomponering uden knald, flammer, gnister, knitren mv.)

— resultaterne af hver forsøgstype

— videnskabelig begrundelse for eventuel anvendelse af et alternativt apparat, samt godtgørelse af korrelationen mellem resultaterne med det specificerede apparat og resultaterne med et tilsvarende apparat

▼B

— nyttige bemærkninger, såsom henvisning til forsøg med lignende produkter, som kan være relevante for korrekt fortolkning af resultaterne

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkning af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING OG EVALUERING AF RESULTATERNE

I testrapporten skal alle resultater, der anses for ukorrekte, unormale eller ikke-repræsentative, nævnes. Hvis der skal ses bort fra nogle af resultaterne, skal dette forklares og resultaterne af supplerende eller alternativ test oplyses. Kan der ikke redegøres for et unormalt resultat, skal det tages for pålydende, og stoffet skal klassificeres i overensstemmelse hermed.

4. **HENVISNINGER**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

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

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

▼B

Tillæg

Eksempel på materialespecifikation for varmefølsomhedstesting (se DIN 1623)

(1) Rør: Materialespecifikation nr. 1.0336.505 g

(2) Mundingsplade: Materialespecifikation nr. 1.4873

(3) Krave med gevind og møtrik: Materialespecifikation nr. 1.3817

Figur 1

Apparat til testing for varmefølsomhed

(alle dimensioner i mm)

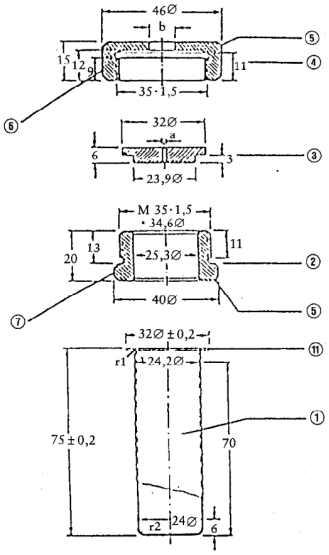


Fig. 1a Stålrør og tilbehør

(1) rør
(1a) udvendig flange
(2) krave med lavfriktionsgevind
(3) mundingsplade a = 2,0 eller 6,0 mm diameter
(4) møtrik b - 10 mm diameter
(5) rejfet kant
(6) 2 spændflader til 41 mm nøgle

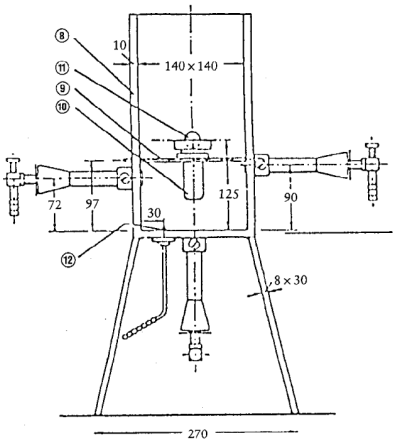


Fig. 1b Opvarmnings- og beskyttelsesanordning

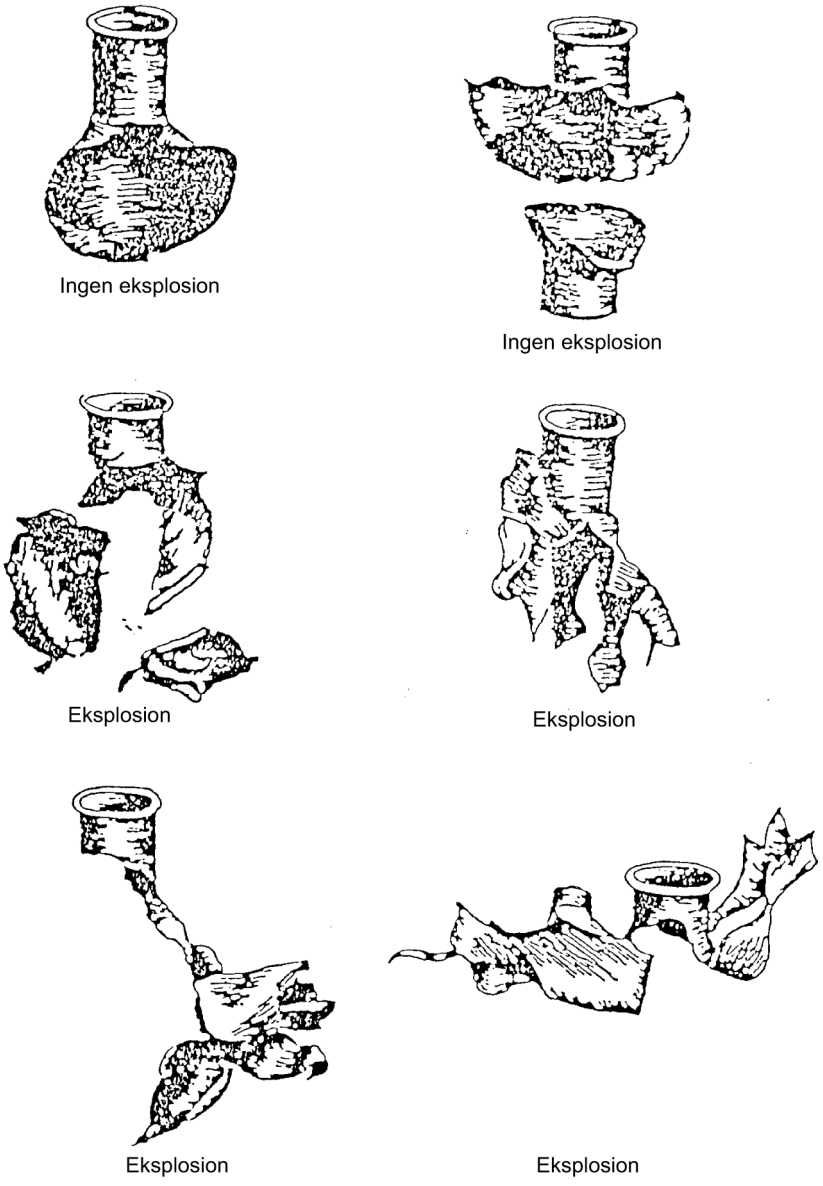
(7) 2 spændflader til 36 mm nøgle
(8) sprængstyksikkert kammer
(9) 2 bærestænger til røret
(10) samlet rør
(11) bageste brænders position; de andre brændere er synlige
(12) vågeflamme

▼B

Figur 2

Test for varmefølsomed

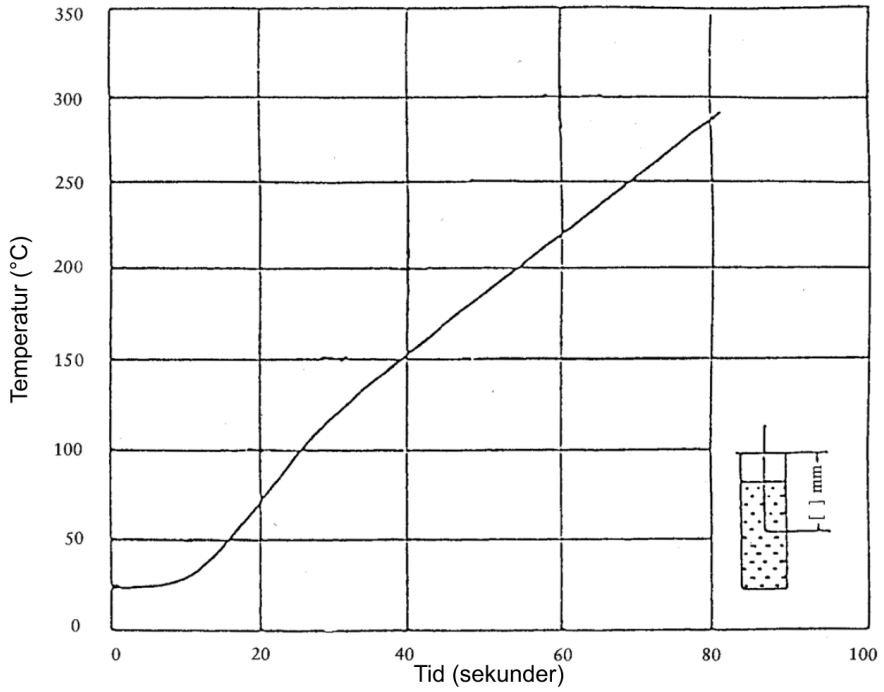
Eksempler på fragmentering



▼B

Figur 3

Kalibrering af opvarmingshastigeden ved test af varmefølsomed



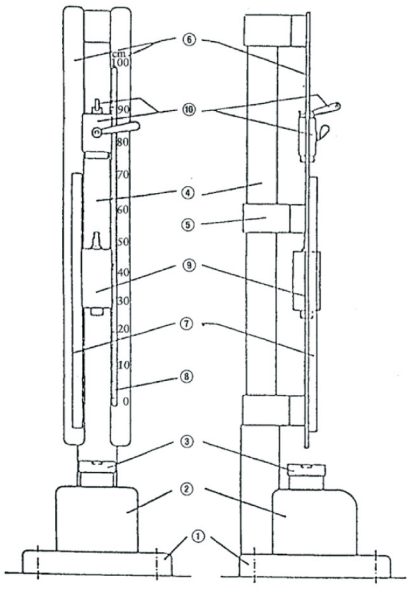
Kurve over temeraturforløbet mod tiden ved opvarmning af dibutylphthalat (27 cm_3 i et lukket rør (mundingslade med 1,5 mm hul) med et propanflow på 3,2 litter/minut. Temperaturen er målt med chromel/alumel-termoelement med 1 mm indkapsling i rustfrit stål, anbragt central 43 mm under rørets overkant. Mellen 135 °C og 285 °C skal opvarmningshastigheden være 185-215 K/minut.

▼B

Figur 4

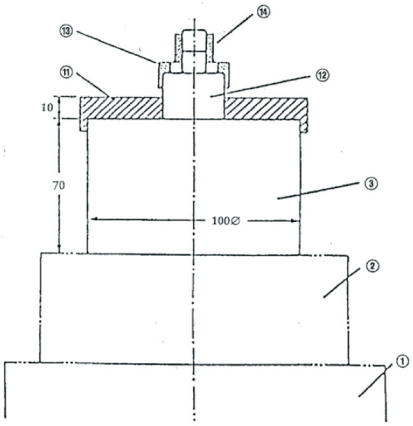
Apparat til slagprøvning

(alle dimensioner i mm)



Figur 4a. Faldhammer, forfra og fra siden, oversigtstegning

(1) bundplade, 450 x 450 x 60
(2) stålblok, 230 x 250 x 200
(3) ambolt, 100 (diameter) x 70
(4) stander
(5) mellemtravers
(6) 2 styr
(7) tandstang



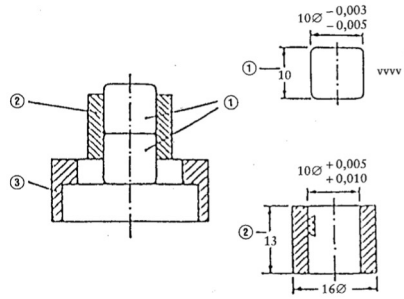
Figur 4b. Faldhammer, nederste del

(8) skala
(9) faldhammer (faldlod)
(10) fastholdelses- og frigørelsesanordning
(11) holdeplade
(12) mellemambolt (udskiftelig) 26 (diameter) x 26
(13) holdering med åbninger
(14) slaganordning

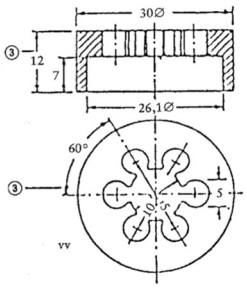
▼B

Figur 4

Fortstat

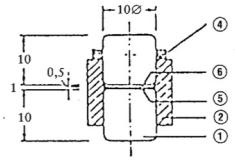


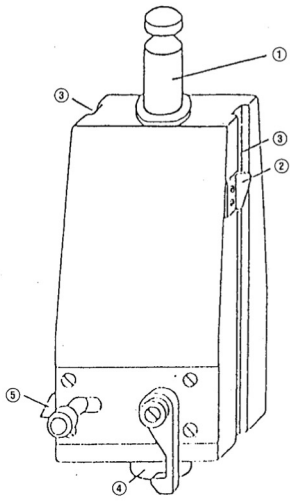
Figur. 4c. Slaganordning for stoffer, der foreligger i form af pulver eller pasta



Figur. 4d. Slaganordning for væsker

(1) stålcylindre
(2) styrering for stålcylindrene
(3) holdering med åbninger
(a) lodret snit
(b) plan
(4) gummiring
(5) væske (40 mm^3)
(6) væskefrit rum





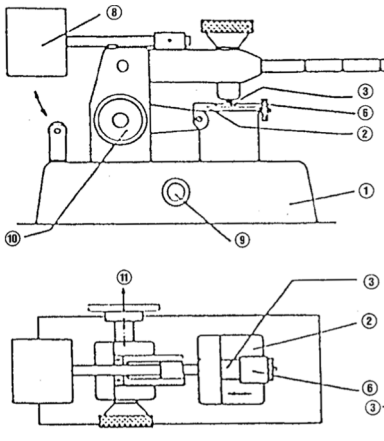
Figur. 4e. Hammer (faldlod på 5 kg)

(1) ophængningstap
(2) højdemærke
(3) styrefals
(4) cylindrisk slaghoved
(5) bagslagshage

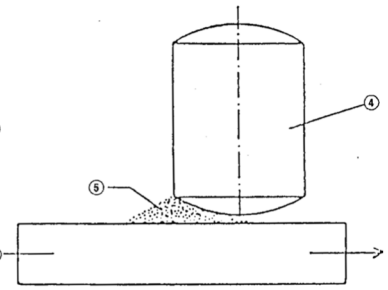
▼B

Figur 5

Apparat til friktionsfølsomhed



Figur 5a. Friktionsapparat – vertikalprojektion og grundrids



Figur 5b. Stiftens udgangsposition på prøven

(1) bundplade af stål
(2) slæde
(3) porcelænsplade 25 x 25 x 5 mm fastholdt på slæden
(4) fast porcelænsstift, 10 (diameter) x 15 mm
(5) prøve, ca. 10 mm^3
(6) stiftholder
(7) belastningsarm
(8) kontravægt
(9) afbryder
(10) hjul til indstilling af slæden i udgangsstillingen
(11) til elmotor

▼B

A.15. SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR VÆSKER OG GASSER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test. Testproceduren kan anvendes for gasser, væsker og dampe, som kan antændes af en hed overflade under tilstedeværelse af luft.

Selvantændelsestemperaturen kan påvirkes betydeligt i nedadgående retning af katalytiske urenheder, af overfladematerialet og af en større testbeholder.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Tendensen til selvantændelse udtrykkes ved selvantændelsestemperaturen. Selvantændelsestemperaturen er den laveste temperatur, ved hvilken teststoffet bryder i brand i blanding med luft under de i testmetoden definerede betingelser.

1.3. REFERENCESTOFFER

I standarderne (se 1.6.3) er der nævnt referencestoffer. De skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODENS PRINCIP

Ved metoden bestemmes den laveste temperatur af den indvendige overflade af et lukket rum, ved hvilken en gas, damp eller væske, der sprøjtes ind i rummet, bryder i brand.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden afhænger af området for selvantændelsestemperaturen og af den anvendte testmetode.

Følsomheden og specificiteten afhænger af den anvendte testmetode.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

Apparaturet er beskrevet i den metode, der henvises til i 1.6.3.

1.6.2. **Testbetingelser**

En prøve af stoffet testes i overensstemmelse med den metode, der henvises til i 1.6.3.

1.6.3. **Udførelse af testen**

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

▼B

2. **DATA**

Testtemperaturen, atmosfæretrykket, den anvendte mængde prøvemateriale og tidsrummet, indtil der sker antændelse, registreres.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— den anvendte testmængde og atmosfæretrykket

— det anvendte apparatur

— måleresultaterne (testtemperatur, resultaterne af antændelsen og det hertil svarende tidsrum)

— alle yderligere oplysninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

Ingen.

▼B

A.16. RELATIV SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR FASTE STOFFER

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test.

Formålet med denne test er at fremskaffe foreløbige oplysninger om faste stoffers selvantændelighed ved høj temperatur.

Hvis den varme, der udvikles enten ved stoffets reaktion med luften eller ved eksoterm dekomponering, ikke bortledes hurtigt nok til omgivelserne, sker der en opvarmning, der fører til selvantændelse. Selvantændelse kan derfor finde sted, når varmeproduktionen sker hurtigere end varmeafgivelsen.

Testmetoden egner sig til foreløbig screening af faste stoffer. Da antændelse og forbrænding af faste stoffer er meget kompleks, bør den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, kun benyttes til sammenligningsformål.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, er den laveste omgivende temperatur udtrykt i ^{o}C, hvorved en bestemt mængde af et stof bryder i brand under veldefinerede betingelser.

1.3. REFERENCESTOF

Ingen.

1.4. METODENS PRINCIP

En bestemt mængde af teststoffet anbringes i en ovn ved stuetemperatur; medens ovntemperaturen hæves med 0,5 ^{o}C/min til smeltepunktet, dog højst til 400 ^{o}C, registreres temperaturen midt i prøven som funktion af tiden. I forbindelse med denne test benævnes den ovntemperatur, ved hvilken prøvens temperatur når op på 400 ^{o}C ved selvopvarmning, selvantændelsestemperaturen.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

1.6.1.1. *Ovn*

En temperaturprogrammeret laboratorieovn (volumen ca. 2 liter) med fri konvektion og eksplosionsaflastning. For at imødegå enhver eksplosionsfare må eventuelle dekomponeringsgasser ikke kunne komme i berøring med varmelegemet.

▼B

1.6.1.2. *Terning af ståltrådsnet*

Et stykke ståltrådsnet med maskevidden 0,045 mm skæres ud efter tegningen i figur 1. Det foldes til terninger, hvor den ene side er åben, og fastholdes med ståltråd.

1.6.1.3. *Termoelementer*

Egnede termoelementer.

1.6.1.4. *Skriver*

En to-kanals skriver, der er kalibreret op til 600 °C eller en tilsvarende spænding.

1.6.2. **Testbetingelser**

Stoffer testes i den form, de modtages i.

1.6.3. **Udførelse af testen**

Terningen fyldes med teststoffet, og der bankes let på den under tilsætning af mere af stoffet, indtil den er helt fyldt. Dernæst ophænges terningen midt i ovnen ved stuetemperatur. Det ene termoelement anbringes midt i terningen, det andet mellem terningen og ovnvæggen til måling af ovntemperaturen.

Ovntemperaturen og prøvetemperaturen registreres løbende, mens ovntemperaturen hæves til 400 °C, dog højst til stoffets smeltepunktet, med en hastighed på 0,5 °C/min.

Antændelse af stoffet vil vise sig som en meget stejl temperaturstigning i prøven sammenlignet med ovntemperaturen.

2. **DATA**

Den ovntemperatur, ved hvilken prøven som følge af selvopvarmning når op på en temperatur på 400 °C, er relevant for evaluering (se figur 2).

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— en beskrivelse af teststoffet

— måleresultaterne, herunder temperatur/tid-kurven

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

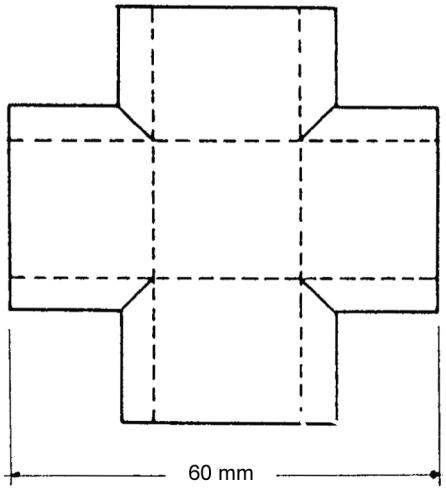
4. **HENVISNINGER**

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

▼B

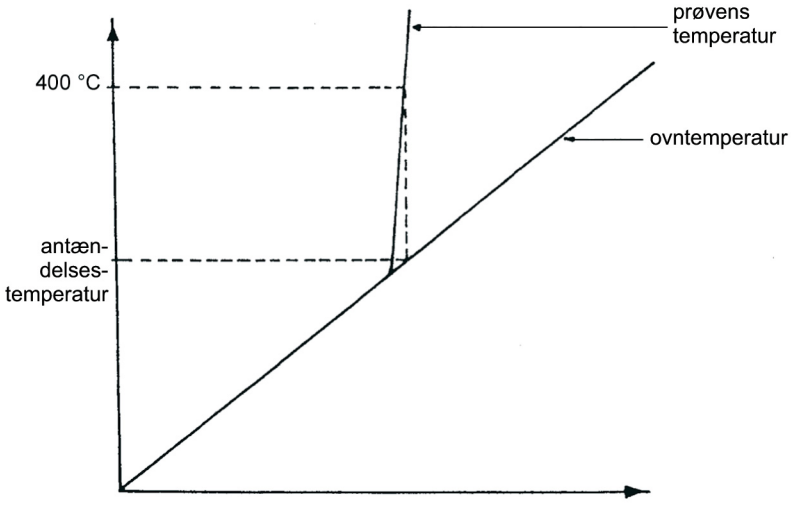
Figur 1

Tegning af 20 mm testterning



Figur 2

Typisk temperatur/tid-kurve



▼B

A.17. OXIDERENDE EGENSKABER (FASTE STOFFER)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Denne test kan ikke anvendes på væsker, gasser, eksplosive og yderst let antændelige stoffer samt organiske peroxider.

Det er ikke nødvendigt at udføre denne test, hvis det på grundlag af strukturformelen kan godtgøres, at stoffet med stor sandsynlighed ikke kan reagere eksotermt med et brændbart materiale.

Der udføres en indledende test til konstatering af, om den egentlige test skal udføres under iagttagelse af særlige forsigtighedsregler.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Reaktionstid: den reaktionstid i sekunder, der kræves, for at reaktionszonen breder sig hen ad en vold, efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i 1.6.

Reaktionshastighed: udtrykkes i millimeter pr. sekund.

Største reaktionshastighed: den største af de reaktionshastigheder, der bestemmes med blandinger indeholdende 10 til 90 vægtprocent af det oxiderende stof.

1.3. REFERENCESTOF

Som referencestof til testen og screeningstesten benyttes bariumnitrat (analysekvalitet).

Referenceblandingen er den blanding af bariumnitrat og pulveriseret cellulose, fremstillet efter 1.6, som har den største reaktionshastighed (normalt en blanding indeholdende 60 vægtprocent bariumnitrat).

1.4. METODENS PRINCIP

Af sikkerhedshensyn udføres der en indledende screeningstest. Viser denne indledende test klart, at stoffet har oxiderende egenskaber, behøves der ikke yderligere testing. Er dette ikke tilfældet, underkastes stoffet en fuldstændig test.

Ved den fuldstændige test blandes teststoffet og et veldefineret brændbart stof i forskellige forhold. Hver blanding arrangeres i en vold, der antændes i den ene ende. Den største målte reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Alle påkrævede formalings- og blandemetoder kan anvendes under den forudsætning, at den største reaktionshastighed i hver af de seks enkeltforsøg ikke afviger fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelse**

1.6.1.1. *Teststof*

Prøven reduceres til en partikelstørrelse på < 0,125 mm på følgende måde: Teststoffet sigtes, hvorefter den tilbageholdte fraktion formales, og denne fremgangsmåde gentages, indtil hele testmængden har passeret sigten.

Alle formalings- og sigtemetoder, der opfylder kvalitetskriterierne, kan anvendes.

Før fremstilling af blandingen tørres stoffet ved 105 °C til konstant vægt. Hvis teststoffets dekomponeringstemperatur er lavere end 105 °C, tørres stoffet ved en passende lavere temperatur.

1.6.1.2. *Brændbart stof*

Som brændbart stof anvendes der pulveriseret cellulose af den type, der bruges til tyndtlagskromatografi eller søjlekromatografi. En type, hvor 85 % af fibrene har en længde på mellem 0,020 og 0,075 mm, har vist sig egnet. Cellulosepulveret sigtes på en sigte med en maskevidde på 0,125 mm. Der bruges cellulose fra samme batch til hele testen.

Før fremstilling af blandingen tørres cellulosepulveret ved 105 °C til konstant vægt.

Hvis der benyttes savsmuld til den indledende test, fremstilles dette ved opsamling af den fraktion, der passerer gennem en sigte med maskevidden 1,6 mm, omhyggelig blanding og tørring ved 105 °C i 4 timer i et højst 25 mm tykt lag. Efter afkøling opbevares savsmuldet i en lufttæt beholder, der fyldes så meget som praktisk muligt, indtil der bruges, helst inden 24 timer efter tørringen.

1.6.1.3. *Antændelseskilde*

Som antændelseskilde anvendes der en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Anvendes der en anden antændelseskilde (f.eks. ved test i inert atmosfære), skal dette begrundes og kilden beskrives i rapporten.

1.6.2. **Udførelse af testen**

Bemærk:

Blandinger af oxiderende stoffer med cellulose eller savsmuld skal betragtes som potentielt eksplosive og behandles med passende forsigtighed.

1.6.2.1. *Indledende test*

2 vægtdele tørret stof blandes omhyggeligt med 1 vægtdel tørret cellulose eller savsmuld, og der tildannes en lille kegleformet bunke af blandingen med en grundfladediameter på 3,5 cm og en højde på 2,5 cm, ved at fylde blandingen løst i en kegleformet form (f.eks. en laboratorietragt med tilproppet stilk).

▼B

Bunken anbringes på en kold ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade. Testen udføres i stinkskab på samme måde som testen i 1.6.2.2.

Antændelseskilden bringes i berøring med bunken. Den efterfølgende reaktions voldsomhed og varighed iagttages og registreres.

Hvis reaktionen er voldsom, skal stoffet anses for oxiderende.

Hvis resultatet på nogen måde er tvetydigt, skal den nedenfor beskrevne fuldstændige udbredelsestest udføres.

1.6.2.2. *Udbredelsestest*

Der fremstilles en række blandinger af oxiderende stof og cellulose indeholdende fra 10 til 90 vægtprocent oxiderende stof og med intervaller på 10 vægtprocent. I grænsetilfælde anvendes der blandinger derimellem, så den største reaktionshastighed bestemmes mere nøjagtigt.

Volden tildannes ved hjælp af en 250 mm lang metalform, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Denne indretning fyldes løst med et lille overskud af blandingen. Efter at man har ladet formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde en gang, skrabes overskuddet af med en skråtstillet plade. Sidestykkerne fjernes, og det resterende pulver glattes ud med en valse. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under testen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Da cellulose og visse teststoffer er hygroskopiske, skal testen udføres så hurtigt som muligt.

Volden antændes i den ene ende ved berøring med en flamme.

Når reaktionszonen har forplantet sig 30 mm, måles dens udbredelseshastighed over de næste 200 mm.

Testen udføres med referencestoffet og mindst én gang med hver af blandingerne af teststof med cellulose.

Hvis den fundne største reaktionshastighed er væsentligt større end referenceblandingens, kan testen afbrydes; i modsat fald gentages forsøget fem gange med hver af de tre blandinger, der giver den største reaktionshastighed.

▼B

Hvis der er mistanke om, at der er fremkommet et falsk positivt resultat, gentages testen med et inert materiale med tilsvarende partikelstørrelse i stedet for cellulosen, f.eks. kiselgur. Alternativt kan den blanding af teststof og cellulose, som har den højeste reaktionshastighed, testes i inert atmosfære (< 2 % v/v oxygen).

2. **DATA**

Af sikkerhedshensyn anses den største reaktionshastighed — og ikke gennemsnittet — for at være den karakteristiske oxiderende egenskab ved det undersøgte stof.

Den højeste værdi af reaktionshastigheden af en serie på seks forsøg med en given blanding er relevant for vurderingen.

Hver enkelt blandings højeste reaktionshastighed afbildes mod koncentrationen af oxiderende stof. Den største reaktionshastighed aflæses på kurven.

De seks værdier af reaktionshastigheden, som er fundet med den blanding, der har den største reaktionshastighed, må ikke afvige fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %; i modsat fald må formalings- og blandemetoderne forbedres.

Den fundne største reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed (se 1.3).

Hvis der udføres test i inert atmosfære, sammenlignes den største reaktionshastighed med referenceblandingens største reaktionshastighed bestemt i inert atmosfære.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— det undersøgte stofs identitet, sammensætning, renhedsgrad, vandindhold, m.v.

— eventuel behandling af prøven (f.eks. formaling eller tørring)

— den benyttede antændelseskilde

— måleresultaterne

— reaktionsforløbet (f.eks. forbrænding med flammer fra overfladen, gennembrænding af hele materialet og oplysninger om forbrændingsprodukter)

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne, herunder en beskrivelse af reaktionens voldsomhed (flamme, gnister, røg, ulmen, m.v.) og omtrentlige varighed i den indledende sikkerheds/screeningstest, både af test- og referencestoffet

— resultaterne af test med et inert stof

— eventuelle resultater af test i inert atmosfære.

▼B

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Et stof skal anses for oxiderende, hvis

a) der sker voldsom reaktion under den indledende test

b) den største reaktionshastighed af de blandinger, der er undersøgt ved fuldstændig testning, er højere end eller lige så høj som referenceblandingens (dvs. cellulose og bariumnitrat) største reaktionshastighed.

For at undgå falske positive resultater skal de resultater, der opnås ved test af stoffet med et inert materiale og/eller i inert atmosfære, også tages i betragtning ved fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

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

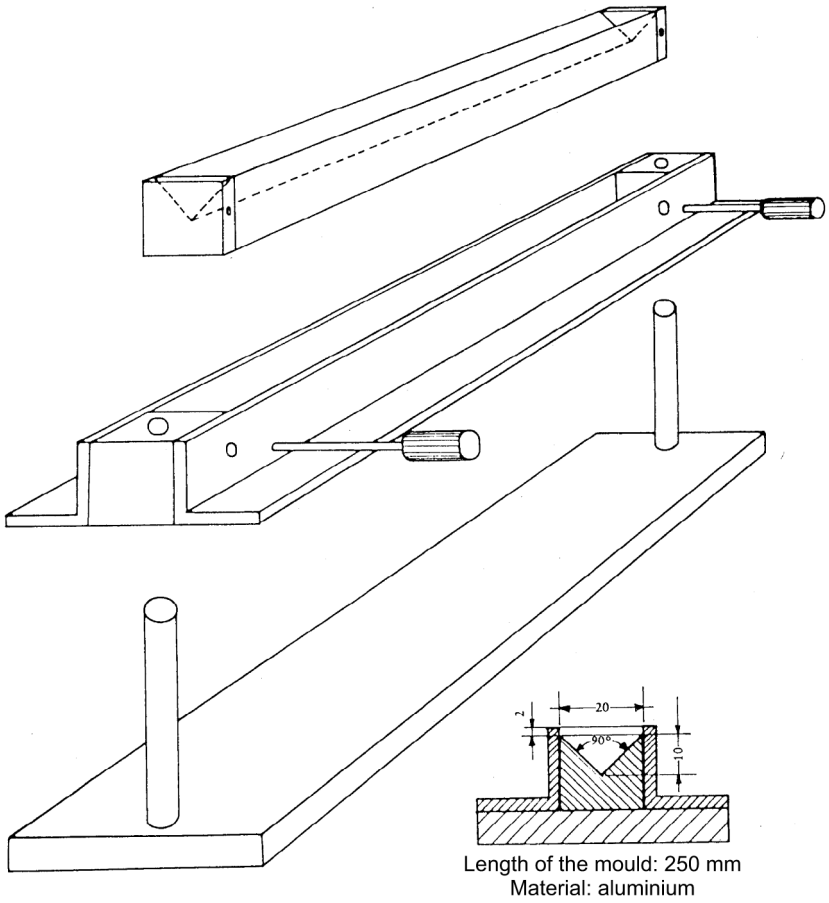
▼B

TILLÆG

Figur

Form og tilbehor til fremstilling af provolden

(alle dimensioner i mm)



▼B

A.18. **POLYMERERS ANTALSMIDDELMOLEKYLVÆGT OG MOLEKYLVÆGTSFORDEL ING**

1. **METODE**

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 118 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i henvisning (1).

1.1. INDLEDNING

Da polymerer kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymerer. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se tillægget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystyrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymerer, f.eks. vandopløselige polymerer og langkædede forgrenede polymerer, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Antalsmiddelmolekylvægten M_n og vægtmiddelmolekylvægten M_w bestemmes ved følgende udtryk:

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

hvor

H_i er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen V_i

M_i er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen V_i

n er antallet af datapunkter.

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte Mn og Mw og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både M_n og M_w) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker, mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porerne, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymerer med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

▼B

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske:

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

(M_p er standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Fremstilling af standardopløsninger af polystyren**

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. **Fremstilling af testopløsning**

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF), ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2 µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

1.6.3. **Apparatur**

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

▼B

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder.

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.4. **Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem**

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.5. **Kolonne**

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

1.6.6. **Teoretiske bunde**

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelse, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et andet passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

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

hvor

N = er antallet af teoretiske bunde

V_e = er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

▼B

W = er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ = er toppens bredde i halv højde

1.6.7. **Adskillelseseffektiviteten**

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

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

hvor

$V_{e,\ Mx}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

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

hvor

V_{e1} og V_{e2} = er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

W_1 og W_2 = er toppenes bredde ved basislinjen

M_1 og M_2 = er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

1.6.8. **Opløsningsmidler**

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.9. **Temperaturregulering**

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR- eller viskositetsdetektor.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig.

M_n, M_w, M_w/M_n og M_p anføres for hver måling. Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log M_p (M_p er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Antals- og vægtmiddelmolekylvægten bestemmes i reglen ved elektronisk databehandling på grundlag af udtrykkene i punkt 1.2. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536/91 (3).

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. **Teststof:**

— foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

▼B

— beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. **Instrumenter:**

— beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— oplysninger om toppenes symmetri

— kolonnetemperatur, temperaturregulering

— detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. **Kalibrering af systemet:**

— detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

— oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater)

— oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen

— alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene M_p, M_n, M_w og M_w/M_n, som oplyst af fabrikanten eller udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — injektionsvolumen og -koncentration

▼B

— benyttet M_p-værdi ved kalibrering

— elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

— M_p-værdi beregnet ved topmaksimum

— procentvis fejl på den beregnede M_p-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. **Evaluering:**

— evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, m.v.)

— oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

— injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml)

— iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. **HENVISNINGER**

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

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

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

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

▼B

Tillæg

Eksempler på andre metoder til bestemmelse af antalsmiddelmolekylvægt (M_n) for polymerer

Gelpermeationskromatografi er den foretrukne metode til bestemmelse af M_n, især når der er rådighed over et sæt standarder med tilnærmelsesvis samme struktur som den pågældende polymer. Hvis der er praktiske problemer med at udføre GPC, eller hvis der allerede er en formodning om, at stoffet ikke kan opfylde det fastsatte M_n-kriterium (og dette ønskes bekræftet), er der alternative metoder til rådighed, f.eks.:

1. **Brug af kolligative egenskaber**

1.1. Ebullioskopi/kryoskopi

består i at måle et opløsningsmiddels kogepunktsforhøjelse (ebullioskopi) eller frysepunktssænkning (kryoskopi), når polymeren tilsættes. Metoden bygger på, at den opløste polymers indvirkning på væskens kogepunkt/frysepunkt afhænger af dens molekylvægt (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

1.2. Damptrykssænkning

består i at måle damptrykket af en valgt referencevæske før og efter tilsætning af en kendt mængde polymer (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$ (teoretisk; i praksis dog af begrænset værdi).

1.3. Membranosmometri

bygger på det osmotiske princip, dvs. opløsningsmiddelmolekylers naturlige tendens til at passere gennem en semipermeabel membran fra en tynd til en mere koncentreret opløsning for at etablere ligevægt. Ved testen har den tynde opløsning en koncentration på nul, mens den mere koncentrerede opløsning indeholder polymeren. Opløsningsmidlets bevægelse gennem membranen giver en trykforskel, der afhænger af polymerens koncentration og molekylvægt (1) (3) (4).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$-$200\,000$.

1.4. Vapour Phase Osmometry

Gasfaseosmometri består i at sammenligne fordampningshastigheden i en ren opløsningsmiddelaerosol med mindst tre aerosoler, der indeholder den pågældende polymer i forskellige koncentrationer (1) (5) (6).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Endegruppeanalyse**

For at kunne bruge denne metode skal man have kendskab både til polymerens overordnede struktur og til kædetermineringsgruppernes karakter (endegrupperne skal kunne skelnes fra hovedskelettet ved f.eks. NMR eller titrering/derivatisering). Ved bestemmelse af den molekylære koncentration af endegrupper i polymeren kan man nå frem til en værdi for molekylvægten (7) (8) (9).

Anvendelsesområde: M_n op til 50 000 (idet pålideligheden aftager).

3. **Henvisninger**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

A.19. **POLYMERERS INDHOLD AF LAVMOLEKYLÆRE BESTANDDELE**

1. **METODE**

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 119 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i henvisningerne.

1.1. INDLEDNING

Da polymerer kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymerer. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se tillægget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymerer, f.eks. vandopløselige polymerer og langkædede forgrenede polymerer, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Lavmolekylære bestanddele defineres arbitrært som bestanddele med en molekylvægt på mindre end 1 000 dalton.

Antalsmiddelmolekylvægten M_n og vægtmiddelmolekylvægten M_w bestemmes ved følgende udtryk:

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

hvor

H_I = er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen V_i

M_i = er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen V_i, og n er antallet af datapunkter

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte M_n og M_w og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både M_w og M_n) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker, mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porerne, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymerer med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

▼B

Af denne kurve udledes indholdet af lavmolekylære bestanddele. Beregningen er kun nøjagtig, hvis de lavmolekylære bestanddele modsvarer polymeren som helhed på massebasis.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske

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

M_p et standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Fremstilling af standardopløsninger af polystyren**

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. **Fremstilling af testopløsning**

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF) ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2 µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

▼B

1.6.3. **Korrektion for indhold af urenheder og additiver**

Det er normalt nødvendigt at korrigere indholdet af bestanddele med M < 1 000 for bidrag fra ikke-polymere bestanddele (f.eks. urenheder og/eller additiver), medmindre der allerede er målt et indhold på < 1 %. Dette gøres ved direkte analyse på polymeropløsningen eller GPC-eluatet.

Hvis eluatet efter passage af kolonnen er for fortyndet til yderligere analyse, må det koncentreres. Det kan være nødvendigt at inddampe eluatet til tørhed og genopløse det. Eluatet skal koncentreres på en sådan måde, at der med sikkerhed ikke sker ændringer i det. Behandlingen af eluatet efter GPC-trinnet vil afhænge af, hvilken analysemetode der anvendes til kvantitativ bestemmelse.

1.6.4. **Apparatur**

GPC-udstyr bestående af følgende komponenter:

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.5. **Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem**

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.6. **Kolonne**

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Teoretiske bunde**

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelsen, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et anden passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

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

hvor,

N = er antallet af teoretiske bunde

V_e = er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

W = er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ = er toppens bredde i halv højde

1.6.8. **Adskillelsereffektiviteten**

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

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

hvor

$V_{e,\ Mx}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

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

hvor

V_{e1} og V_{e2} = er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

W_1 og W_2 = er toppenes bredde ved basislinjen

M_1 og M_2 = er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Opløsningsmidler**

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.10. **Temperaturregulering**

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

1.6.11. **Detektor**

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR-eller viskositetsdetektor.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig. Det er i alle tilfælde vigtigt også at bestemme data for blindprøver, der er behandlet på samme måde som prøven.

Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log M_p (M_p er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Den del af kurven, der svarer til molekylvægte under 1 000, bestemmes og korrigeres efter behov for urenheder og additiver. Elueringskurverne evalueres i reglen ved elektronisk databehandling. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Uopløselig polymer, der måtte være tilbageholdt på kolonnen, vil efter al sandsynlighed have en molekylvægt, der er større end den opløselige fraktions, så hvis den lades ude af betragtning, vil indholdet af lavmolekylære bestanddele blive anslået for højt. I tillægget er der en vejledning i, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer.

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. **Teststof:**

— Foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

— Beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. **Instrumenter:**

— Beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— Pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— Separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— Antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— Oplysninger om toppenes symmetri

— Kolonnetemperatur, temperaturregulering

— Detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— Eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— Dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. **Kalibrering af systemet:**

— Detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

▼B

— Oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater

— Oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen

— Alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene M_p, M_n, M_w, og M_w/M_n, som oplyst af fabrikanten udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — injektionsvolumen og -koncentration

  — benyttet M_p-værdi ved kalibrering

  — elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

  — M_p-værdi beregnet ved topmaksimum

  — procentvis fejl på den beregnede M_p-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. **Oplysninger om indholdet af lavmolekylære bestanddele:**

— beskrivelse af de metoder, der er benyttet til analysen, og hvordan forsøgene er udført

— oplysninger om det procentvise indhold (w/w) af lavmolekylære bestanddele i forhold til hele prøven

— oplysninger om urenheder, additiver og andre ikke-polymere bestanddele i vægtprocent i forhold til hele prøven

2.2.5. **Evaluering:**

— Evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, m.v.)

— Oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— Oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— Beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— Procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— Tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

▼B

— Injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml)

— Iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— Detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— Detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— Alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. **HENVISNINGER**

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

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

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

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

▼B

Tillæg

Vejledning i, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer

Indhold af uopløselig polymer i prøven vil medføre et vist massetab under GPC-analysen. Den uopløselige polymer tilbageholdes irreversibelt på kolonnen eller prøvefiltret, mens den opløselige del af prøven passerer gennem kolonnen. Hvis tilvæksten i polymerens brydningsindeks (dn/dc) kan skønnes eller måles, kan man få et skøn over, hvor stor en masse der er gået tabt på kolonnen. I så fald foretages korrektionen ved hjælp af en ekstern kalibrering med standardmaterialer med kendt koncentration og dn/dc, så refraktometerets udslag kalibreres. I nedenstående eksempel er der benyttet en standard af poly (methylmethacrylat) (pMMA).

Ved ekstern kalibrering med henblik på analyse af acrylpolymere analyseres en pMMA-standard med kendt koncentration i tetrahydrofuran ved GPC, og de fremkomme data benyttes til bestemmelse af refraktometerkonstanten efter følgende udtryk:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

hvor

K = er refraktometerkonstanten (i mikrovolt-sekund/ml)

R = er pMMA-standardens udslag (mikrovolt-sekund)

C = er pMMA-standardens koncentration (i mg/ml)

V = er injektionsvolumenet (i ml), og

dn/dc = er brydningsindekstilvæksten for pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg)

Følgende data er typiske for en pMMA-standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Den fremkomne K-værdi på $3{,}05 \times 10^{11}$ benyttes derefter til beregning af det teoretiske detektorudslag, hvis 100 % af polymeren elueres gennem detektoren.

▼B

A.20. **POLYMERERS OPLØSELIGHED/EKSTRAHERBARHED I VAND**

1. **METODE**

Den beskrevne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 120 (1997). Yderligere tekniske oplysninger findes i henvisning (1).

1.1. INDLEDNING

For visse polymerer, f.eks. emulsionspolymerer, kan det være nødvendigt at gøre yderligere forberedelser, inden den nedenfor beskrevne metode kan benyttes. Metoden kan ikke anvendes for flydende polymerer og polymerer, der kan reagere med vand under testbetingelserne.

Når metoden ikke er bekvem eller er umulig at benytte, må opløseligheden/ekstraherbarheden undersøges ved andre metoder. I så fald skal gives alle detaljer og en begrundelse for valget af metode.

1.2. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vandigt medium bestemmes ved hjælp af kolbemetoden (jf. A.6 Vandopløselighed — kolbemetoden) med de i det følgende beskrevne ændringer.

1.4. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Udstyr**

Der er brug for følgende udstyr til metoden:

— findelingsapparat, f.eks. mølle, til fremstilling af partikler med kendt størrelse

— rysteapparat med mulighed for temperaturregulering

— membranfilter

— egnet analyseudstyr

— standardsigter

1.5.2. **Prøveforberedelse**

En repræsentativ prøve skal først findeles til en partikelstørrelse mellem 0,125 og 0,25 mm bestemt med passende sigter. Af hensyn til prøvens stabilitet, kan køling være påkrævet under formalingen. Materialer af gummiagtig karakter kan knuses ved flydende nitrogens temperatur (1).

Hvis det ikke er muligt at nå ned på den krævede partikelstørrelse, skal der tilstræbes den mindst mulige partikelstørrelse, og det opnåede resultat anføres. Det oplyses i rapporten, hvordan den findelte prøve har været opbevaret indtil udførelse af testen.

▼B

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Der afvejes 3 prøver på hver 10 g af teststoffet i 3 glaskolber med glasprop, og der tilsættes 1 000 ml vand til hver kolbe. Hvis det ikke er praktisk muligt at håndtere 10 g af polymeren, anvendes den største mængde, der kan håndteres, og vandmængden reduceres tilsvarende.

Kolberne lukkes tæt til og omrystes ved 20 °C. Der benyttes en anordning, der kan arbejde ved konstant temperatur. Efter 24 timer centrifugeres eller filtreres indholdet af hver enkelt kolbe, og polymerkoncentrationen i den klare vandfase bestemmes med en passende analysemetode. Findes der ingen passende analysemetoder for vandfasen, kan den samlede opløselighed/ekstraherbarhed skønnes ud fra den tørre vægt af filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen.

Normalt er det nødvendigt at skelne kvantitativt mellem urenheder og additiver på den ene side og lavmolekylære forbindelser på den anden side. Ved gravimetrisk bestemmelse er det ligeledes vigtigt at medtage en blindprøve uden teststof, så der tages højde for restmateriale hidrørende fra forsøgets udførelse.

Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vand ved 37 °C ved pH 2 og pH 9 kan bestemmes som beskrevet ved udførelse af eksperimentet ved 20 °C. pH indstilles ved hjælp af egnede bufferopløsninger, syrer eller baser, f.eks. saltsyre, eddikesyre, natrium- eller kaliumhydroxid af analysekvalitet eller ammoniak.

Der udføres en eller to prøver, afhængigt af den benyttede analysemetode. Når der findes tilstrækkelig specifikke metoder til direkte analyse af vandfasen for polymerkomponenten, skulle én prøve som ovenfor beskrevet være tilstrækkeligt. Hvis der derimod ikke findes sådanne metoder og polymerens opløselighed/ekstraherbarhed må bestemmes indirekte ved analyse af det vandige ekstrakts indhold af organisk kulstof i alt (TOC), bør der udføres endnu en prøve. Prøven bør gentages endnu en gang, denne gang med en ti gange mindre polymermængde men samme vandmængde som ved den første prøve.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Test udført med kun én prøvestørrelse*

I nogle tilfælde findes der metoder til direkte analyse af polymerkomponenter i vandfasen. Alternativt kan man overveje indirekte at analysere for opløste/ekstraherede polymerkomponenter ved at bestemme den samlede mængde opløste bestanddele og korrigere for ikke-polymerspecifikke komponenter.

Analyse af vandfasen for samtlige polymerforbindelser kan foretages ved

enten en tilstrækkelig følsom metode, f.eks.

— TOC-bestemmelse ved nedbrydning til CO_2 med persulfat eller dichromat efterfulgt af måling ved IR eller kemisk analyse

▼B

— atomabsorptionsspektrometri (AAS) eller induktivt koblet plasmaemissionsspektrometri (ICP) for silicium- eller metalholdige polymerer

— UV-absorption ellerr spektrofluorimetri for arylpolymerer

— LC-MS for lavmolekylære prøver

eller ved vakuuminddampning af det vandige ekstrakt til tørhed og analyse af remanensen ved spektroskopi (IR, UV m.v.) eller AAS/ICP.

Hvis det ikke er praktisk muligt at gennemføre en analyse af selve vandfasen, ekstraheres vandekstraktet med et organisk opløsningsmiddel, der ikke er blandbart med vand, f.eks. en chloreret kulbrinte. Derefter afdampes opløsningsmidlet, og remanensen analyseres som ovenfor for indhold af den pågældende polymer. Bestanddele i denne remanens, som identificeres som urenheder eller additiver, fratrækkes, når selve polymerens opløselighed/ekstraherbarhed beregnes.

Når der er forholdsvis store stofmængder til stede, kan det være nødvendigt at foretage f.eks. HPLC- eller GC-analyse af remanensen for at skelne urenheder fra monomere og monomerderivater, så det virkelige indhold af sidstnævnte kan bestemmes.

I nogle tilfælde vil simpel afdampning af det organiske opløsningsmiddel og vejning af den tørre remanens være tilstrækkeligt.

1.5.4.2. *Test udført med to forskellige prøvestørrelser*

Alle vandige ekstrakter analyseres for TOC.

Der foretages gravimetrisk bestemmelse af den del af prøven, der ikke er gået i opløsning. Hvis der efter centrifugering eller filtrering af de enkelte kolbers indhold stadig sidder polymerrester fast på kolbens væg, skylles kolben med filtratet, indtil der ikke længere er synlige rester i kolben. Derefter centrifugeres eller filtreres filtratet igen. Filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen tørres ved 40 ^{o}C under vakuum og vejes. Tørringen fortsættes til konstant vægt.

2. **DATA**

2.1. TEST UDFØRT MED KUN ÉN PRØVESTØRRELSE

Resultaterne for hver enkelt kolbe og gennemsnittet for de 3 kolber anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg/g). Desuden anføres prøvens vægttab (beregnet som vægten af det opløste stof divideret med prøvens begyndelsesvægt). De relative standardafvigelser (RSD) beregnes. Der anføres enkelttal for den samlede stofmængde (polymer + nødvendige additiver) og for polymer alene (dvs. efter subtraktion af bidraget fra disse additiver).

▼B

2.2. TEST UDFØRT MED TO FORSKELLIGE PRØVESTØRRELSER

De enkelte TOC-værdier for de vandige ekstrakter fra de to tredobbeltforsøg og gennemsnitsværdien for hvert forsøg anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg C/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg C/g).

Ingen forskel mellem resultaterne for højt og lavt forhold mellem prøve og vand er tegn på, at alle ekstraherbare komponenter faktisk er ekstraheret. I så fald er direkte analyse normalt ikke påkrævet.

Vægten af hver enkelt remanens anføres, også i procent af den oprindelige prøve. Der beregnes et gennemsnit for hvert forsøg. Det procentvise indhold af opløselige og ekstraherbare stoffer i den oprindelige prøve er givet ved forskellen mellem 100 og de fundne procenttal.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1.1. **Teststof:**

— Foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder, indhold af lavmolekylære bestanddele).

3.1.2. **Forsøgsbetingelser:**

— beskrivelse af den anvendte fremgangsmåde og forsøgsbetingelserne

— beskrivelse af analyse- og detekteringsmetoder.

3.1.3. **Resultater:**

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/l; enkeltværdier og gennemsnit for ekstraktionsforsøgene i de forskellige opløsninger, opdelt på polymer og urenheder, additiver m.v.

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/g polymer

— TOC-værdier for vandige ekstrakter, vægt af opløst stof og beregnet procentværdi, hvis målt

— pH af hver enkelt prøve

— oplysninger om blindprøver

— oplysninger om teststoffets eventuelle kemiske ustabilitet både under testproceduren og under analyseringen

— alle oplysninger, der har betydning for fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prufzwecke.

▼B

A.21. **OXIDERENDE EGENSKABER (VÆSKER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er måling af væskers potentiale for forøgelse af brændbare stoffers forbrændingshastighed eller -intensitet, eller deres potentiale for sammen med et brændbart stof at danne en selvantændelig blanding, når de to stoffer blandes grundigt. Metoden bygger på FN's prøve for oxiderende væsker (1) og er ækvivalent med denne. Da nærværende metode A.21 imidlertid primært er bestemt til at opfylde kravene i forordning (EF) nr. 1907/2006, kræves kun sammenligning med ét referencestof. Forventes prøvningsresultaterne anvendt til andre formål, kan sammenligning med flere referencestoffer dog være nødvendig ([1]).

Denne prøve kræves ikke udført, når det af strukturformlen uden rimelig tvivl fremgår, at stoffet er ude af stand til at reagere eksotermt med et brændbart materiale.

Før prøven udføres, vil det være nyttigt at råde over foreløbige oplysninger om stoffets eventuelle potentielle eksplosionsfarlighed.

Denne prøve finder ikke anvendelse på faste stoffer, gasser, eksplosive eller letantændelige stoffer samt organiske peroxider.

Denne prøve kræves ikke udført, når prøvningsresultater for prøvestoffet foreligger fra FN-prøven for oxiderende væsker (1).

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den gennemsnitlige trykstigningstid er gennemsnitsværdien af de ved prøvningen foretagne målinger af den tid, det tager prøveblandingen at frembringe en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfæretrykket.

1.3. REFERENCESTOF

Som referencestof anvendes 65 % (w/w) salpetersyre (analytisk kvalitet) ([2]).

([1]) Som f.eks. i rammerne af FN's transportregulativer.
([2]) Syren skal inden prøven titreres for at bekræfte dens styrke.

▼B

Hvis forsøgslederen forventer, at prøveresultaterne senere kan tænkes anvendt til andre formål ([1]), kan også andre referencestoffer om ønsket afprøves ([2]).

1.4. PRØVNINGSMETODENS PRINCIP

Prøvevæsken blandes med fibercellulose i masseforholdet 1:1 og overføres til en trykbeholder. Forekommer der under blanding eller overføring selvantændelse, er yderligere prøvning unødvendig.

Hvis selvantændelse ikke opstår, gennemføres hele prøven. Blandingen opvarmes i en trykbeholder, og gennemsnitstiden for en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfæretrykket beregnes. Resultatet sammenholdes med den gennemsnitlige trykstigningstid for blandingen af referencestof og cellulose i forholdet 1:1.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I en serie bestående af 5 forsøg på samme stof må ingen resultater afvige mere end 30 % fra det aritmetiske gennemsnit. Resultater, som afviger over 30 % fra gennemsnittet, skal kasseres, blandings- og påfyldningsproceduren forbedres, og prøvningen gentages.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelse**

1.6.1.1. *Brændbart stof*

Tørret fibercellulose med fiberlængde mellem 50 og 250 μm og gennemsnitsdiameter 25 μm anvendes som brændbart stof ([3]). Dette tørres til konstant vægt i et højst 25 mm tykt lag ved 105 °C i 4 timer og opbevares i exsikkator med tørremiddel, indtil det er afkølet og klart til brug. Vandindholdet i den tørrede cellulose skal være under 0,5 % på tør massebasis ([4]). Om nødvendigt forlænges tørretiden for at opnå dette ([5]). Der skal anvendes cellulose fra samme batch under hele prøven.

([1]) Som f.eks. i rammerne af FN's transportregulativer.
([2]) F.eks. anvendes i reference (1) 50 % (w/w) perchlorsyre og 40 % (w/w) natriumchlorat.
([3]) F.eks. Whatman cellulosepulver til søjlekromatografi CF 11, katalog nr. 4021 050.
([4]) Bekræftet ved (f.eks.) Karl-Fisher titrering.
([5]) Alternativt kan dette vandindhold også opnås (f.eks.) ved opvarmning til 105 °C under vakuum i 24 timer.

▼B

1.6.1.2. *Apparatur*

1.6.1.2.1. Trykbeholder

Prøvningen skal udføres med en trykbeholder. Beholderen er en cylindrisk trykbeholder af stål med længde 89 mm og Ø udvendig 60 mm (se figur 1). To modstående flader af beholderen er bearbejdet (således at beholderens tværsnit er reduceret til 50 mm) for at lette fastholdelsen under montering af tændrør og udluftnings-prop. Beholderen, hvis boring er Ø 20 mm, er indvendigt falset i hver ende til en dybde af 19 mm og forsynet med gevind til isætning af 1" britisk standardrør (BSP)eller tilsvarende metrisk størrelse. Et trykudtag i form af et siderør er skruet ind i beholderens hvælvede overflade 35 mm fra den ene ende og i en vinkel på 90° med de bearbejdede overflader. Til montering af siderøret er udført en 12 mm dyb boring med gevind til ½" BSP (eller tilsvarende metrisk størrelse) på enden af siderøret. Om nødvendigt anvendes en pakning af inaktivt materiale for at sikre gastæt samling. Grenrøret rager 55 mm uden for trykbeholderens hus og har en boring på 6 mm. Enden af siderøret er falset og forsynet med gevind for tilslutning af tryk-transducer af membrantypen. Enhver trykmåleanordning kan anvendes, forudsat at den ikke påvirkes af de varme gasser eller nedbrydningsprodukter og reagerer på en trykstigning på 690-2 070 kPa inden for højst 5 ms.

Den ende af trykbeholderen, som er længst fra siderøret, lukkes med et tændrør, som er monteret med to elektroder, hvoraf den ene er isoleret fra rørets hus, og den anden er jordforbundet til huset. Den modsatte ende af trykbeholderen lukkes med en sprængskive (sprængningstryk ca. 2 200 kPa), som fastholdes af en låseprop med boring Ø 20 mm. Om nødvendigt anvendes til tændrøret en pakning af inaktivt materiale for at sikre gastæt samling. Et stativ (figur 2) holder enheden i korrekt stilling under brug. Stativet består sædvanligvis af en fod af blødt stål med målene 235 mm × 184 mm × 6 mm og et 185 mm langt stykke firkantet hulprofil 70 mm × 70 mm × 4 mm.

I den ene ende af hulprofilen bortskæres en del af hver af to modstående sider, således at man opnår en struktur, som har to ben med flade sider og opadtil fortsætter i et 86 mm langt stykke intakt kasseprofil. Enderne af disse flade sider skæres af i en vinkel på 60° med det vandrette plan og svejses fast på fodpladen. I den ene side af fodstykkets øverste ende foretages en 22 mm bred og 46 mm dyb udfræsning, som giver plads til siderøret, når trykbeholderen med tændrøret først sænkes ned i kasseprofilstativet. Forneden på kasseprofilens indvendige overflade fastsvejses et stykke stål med bredde 30 mm og tykkelse 6 mm, der fungerer som afstandsstykke. Til fastholdelse af trykbeholderen anvendes to 7 mm fingerskruer, som sidder i skruehuller i den modstående flade. Nedefra støttes trykbeholderen af to 12 mm brede bånd af 6 mm tykt stål, fastsvejst på sidestykkerne, som ligger op ad kasseprofilens nederste ende.

▼B

1.6.1.2.2. Tændsystem

Tændsystemet består af en 25 cm lang Ni/Cr ledning Ø 0,6 mm med en modstand på 3,85 ohm/m. Ledningen er spiralviklet ved hjælp af en stang Ø 5 mm og fastgjort til tændrørets elektroder. Spiralen skal være udformet på en af de i figur 3 viste måder. Afstanden fra beholderens bund til tændspolens underside skal være 20 mm. Er elektroderne ikke justerbare, skal enderne af tændtråden mellem spolen og beholderens underside være isoleret med en keramisk foring. Ledningen opvarmes af en konstant strømforsyning, som kan yde mindst 10 A.

1.6.2. **Prøvens udførelse** ([1])

Apparatet, komplet med tryktransducer og opvarmningssystem, men uden sprængskive, anbringes under-støttet med tændrøret nedad. I et bægerglas blandes 2,5 g af prøvevæsken med 2,5 g tørret cellulose ved hjælp af en glasspatel ([2]). Mens blandingen finder sted, skal der være anbragt sikkerhedsskærm mellem operatøren og blandingen. Hvis der under blanding eller overføring sker selvantændelse, er yderligere prøvning unødvendig. Blandingen påfyldes trykbeholderen i små portioner ved at banke let, idet man sørger for at blandingen pakkes tæt omkring tændspolen og har god kontakt til denne. Det er vigtigt at spolen ikke forvrides under denne pakkeproces, da prøvningen ellers kan give forkerte resultater ([3]). Sprængskiven sættes på plads, og låseproppen skrues forsvarligt fast. Den fyldte beholder overføres til støttefoden med sprængskiven opad; støttefoden skal anbringes i et passende armeret stinkskab eller en brandcelle. Strømforsyningen tilsluttes tændrørets udvendige klemmer, og der påføres 10 A. Tiden fra sammenblandingen påbegyndes til strømmen sluttes, må ikke overstige 10 minutter.

Tryktransducerens signal registreres på et passende system, hvormed den opnåede trykprofil både kan vurderes og optegnes permanent (f.eks. en transientoptager koblet til en punktskriver). Blandingen opvarmes, indtil sprængskiven brydes, eller til der er gået mindst 60 s. Hvis sprængskiven ikke brydes, lader man blandingen afkøle, før apparatet forsigtigt adskilles, efter at der er truffet forholdsregler over for eventuelt overtryk. Der udføres 5 prøver med prøvestof og referencestof(fer). Den tid, det tager trykket at stige fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfæretrykket, noteres. Den gennemsnitlige trykstigningstid beregnes.

I visse tilfælde kan et stof frembringe en trykstigning (for høj eller for lav), som skyldes kemiske reaktioner, der ikke karakteriserer stoffets oxiderende egenskaber. I så fald kan det være nødvendigt at gentage prøven med et inaktivt stof, f.eks. diatoméjord (kiselgur), i stedet for cellulose for at klarlægge reaktionens art.

([1]) Blandingen af oxiderende stoffer og cellulose skal behandles som eksplosionsfarlig og håndteres med tilbørlig forsigtighed.

([2]) I praksis kan dette gøres ved at man fremstiller en 1:1 blanding af prøvevæske og cellulose i større mængde end nødvendigt til prøven og overfører 5 ± 0,1 g til trykbeholderen. Blandingen skal være frisk fremstillet til hver prøvning.

([3]) Navnlig må spolens naboviklinger ikke røre hinanden.

▼B

2. **DATA**

Trykstigningstider for både prøvestof og referencestof(fer). Trykstigningstider for eventuelle prøver udført med inaktivt stof.

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

De gennemsnitlige trykstigningstider for prøvestof og referencestof(fer) beregnes.

Den gennemsnitlige trykstigningstid for eventuelle prøver udført med inaktivt stof beregnes.

I tabel 1 er givet nogle eksempler på resultater.

Tabel 1

Eksempler på resultater [a]

Stof [b]	Gennemsnitlig trykstigningstid for en 1:1 blanding med cellulose (ms)
Ammoniumdichromat, mættet vandig opløsning	20 800
Calciumnitrat, mættet vandig opløsning	6 700
Ferrinitrat, mættet vandig opløsning	4 133
Lithiumperchlorat, mættet vandig opløsning	1 686
Magnesiumperchlorat, mættet vandig opløsning	777
Nikkelnitrat, mættet vandig opløsning	6 250
Salpetersyre, 65 %	4 767 [c]
Perchlorsyre, 50 %	121 [c]
Perchlorsyre, 55 %	59
Kaliumnitrat, 30 % vandig opløsning	26 690
Sølvnitrat, mættet vandig opløsning	[d]
Natriumchlorat, 40 % vandig opløsning	2 555 [c]
Natriumnitrat, 45 % vandig opløsning	4 133
Inaktivt stof	
Vandxellulose	[d]

[a] Vedrørende FN-transportklassifikation henvises til ref. (1).
[b] Mættede opløsninger skal fremstilles ved 20 °C.
[c] Gennemsnitsværdi af sammenlignende laboratorieprøvninger.
[d] Det maksimale tryk 2 070 kPa ikke nået.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. PRØVNINGSRAPPORT

Prøvningsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— det afprøvede stofs identitet, sammensætning, renhed mv.

— prøvestoffets koncentration

— metode benyttet til tørring af den anvendte cellulose

— vandindholdet i den anvendte cellulose

— måleresultaterne

— resultater af eventuelle prøvninger med inaktivt stof

— beregnede gennemsnitlige trykstigningstider

— eventuelle afvigelser fra denne metode og begrundelsen derfor

— alle supplerende oplysninger og bemærkninger, som er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE ([1])

Prøvningsresultaterne bedømmes på grundlag af:

a) om blandingen af prøvestof og cellulose selvantænder, og

b) sammenholdelse af den gennemsnitlige tid, der går til en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa, med den tilsvarende værdi for referencestoffet (-stofferne).

Et væskeformigt stof anses for oxiderende, når:

a) en blanding af stoffet og cellulose i masseforholdet 1:1 selvantænder, eller

b) den gennemsnitlige trykstigningstid af en blanding af prøvestoffet og cellulose i masseforholdet 1:1 højst er lig den gennemsnitlige trykstigningstid for en blanding af 65 % (w/w) vandig salpetersyre og cellulose i masseforholdet 1:1.

For at undgå falske positive resultater må bedømmelsen af resultaterne om nødvendigt også inddrage resultaterne af prøvning af stoffet med inaktivt materiale.

([1]) Vedrørende fortolkning af resultater med brug af flere referencestoffer i henhold til FN's transportregulativer henvises til reference (1).

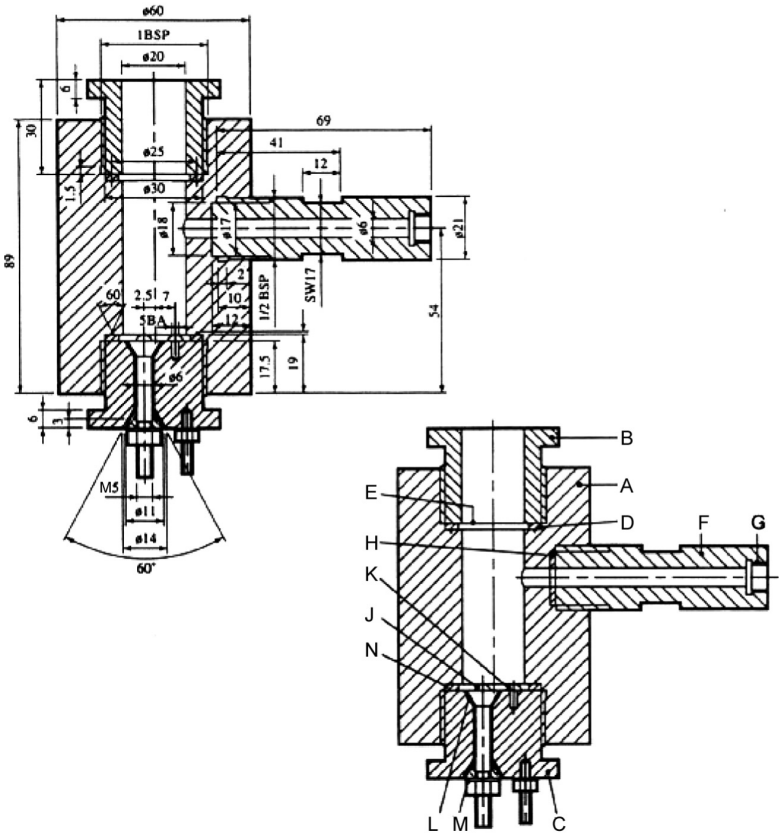
▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Fig. 1

Trykbeholder

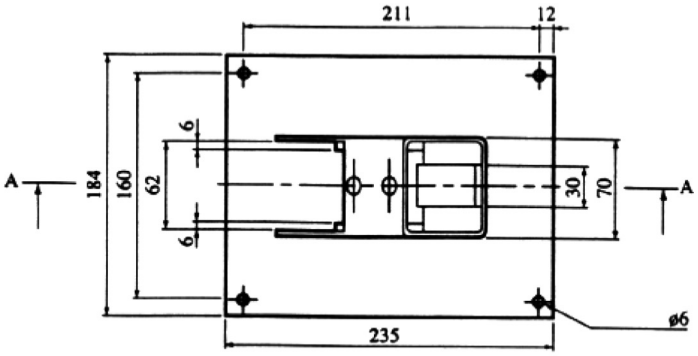


(A) Trykbeholderlegeme	(B) Låseprop for sprængskive	(C) Tændrør
(D) Blød blyskive	(E) Sprængskive	(F) Siderør
(G) Tryktransducerhoved	(H) Skive	(J) Isoleret elektrode
(K) Jordforbundet elektrode	(L) Isolering	(M) Stålkonus
(N) Skiveforvridende rille		

▼B

Fig. 2

Stativ



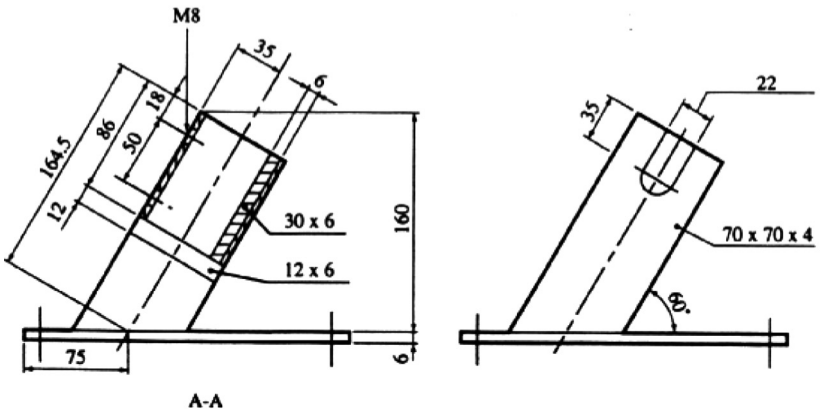
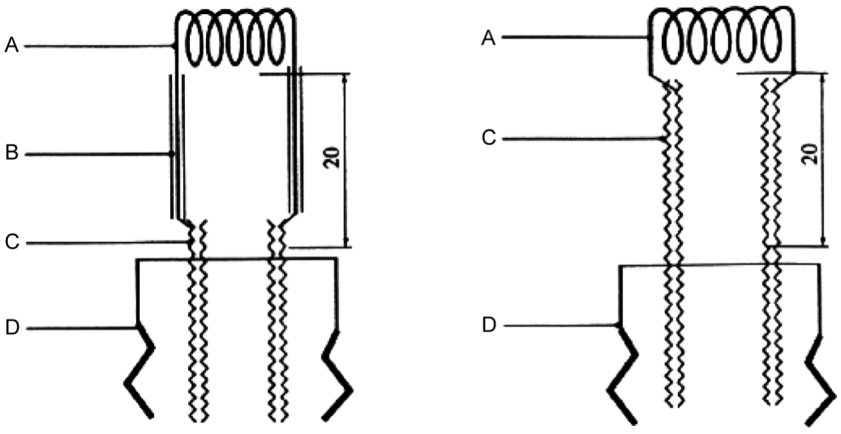


Fig. 3

Tændsystem

(A) Tændspole (B) Isolering (C) Elektroder (D) Tændrør



Note: Begge disse opstillinger kan bruges.

▼M1

A.22. **FIBRES LÆNGDEVÆGTEDE GEOMETRISKE MIDDELDIAMETER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Denne metode beskriver en procedure til måling af den længdevægtede geometriske middeldiameter (Length Weighted Geometric Mean Diameter — LWGMD) af syntetiske mineralfibre i løs vægt (Man Made Mineral Fibres — MMMF). Idet LWGMD af populationen med 95 % sandsynlighed vil ligge mellem 95 % konfidensgrænserne (LWGMD ± to standardfejl) af prøven, vil den fremkomne værdi (testværdien) være den laveste 95 % konfidensgrænse af prøven (dvs. LWGMD — 2 standardfejl). Metoden er baseret på et opdateret udkast (juni 1994) til HSE's industriprocedure, som blev fastlagt på et møde mellem ECFIA og HSE i Chester den 26. september 1993, og som er udviklet for og med udgangspunkt i et yderligere forsøg blandt forskellige laboratorier (1, 2). Denne målemetode kan anvendes til at bestemme fiberdiameteren af bulk-materialer eller produkter, der indeholder MMMF'er, herunder ildfaste keramiske fibre (RCF), Man-Made Vitreous Fibres (MMVF — fællesbetegnelse for syntetiske fibre indeholdende siliciumdioxid og en række andre metaloxider) og endelig krystallinske og polykrystallinske fibre.

Længdevægtning er en metode, der skal kompensere for den virkning af diameterfordelingen, der skyldes brud på lange fibre, når materialer udsættes for prøveudtagning eller håndtering. Der anvendes geometrisk statistik (geometrisk middelværdi) til at måle størrelsesfordelingen af MMMF-diametre, idet disse diametre almindeligvis har størrelsesfordelinger, der tilnærmer sig log-normal.

Måling af både længde og diameter er ensformigt og tidskrævende, men hvis man kun måler de fibre, der rører en uendelig tynd linje på et SEM-synsfelt, vil sandsynligheden for at vælge en given fiber være proportional med dens længde. Da der her tages hensyn til længden i beregninger om længdevægtning, er der kun behov for diameteren, hvorefter LWGMD-2SE kan beregnes som beskrevet.

1.2. DEFINITIONER

Partikel: et objekt med et længde-breddeforhold på mindre end 3:1.

Fiber: et objekt med et længde-breddeforhold (formatforhold) på mindst 3:1.

1.3. ANVENDELSESOMRÅDE OG BEGRÆNSNINGER

Metoden er udviklet med fokus på diameterfordelinger med mediandiametre fra 0,5 μm til 6 μm. Større diametre kan måles ved hjælp af mindre SEM-forstørrelser, men metoden bliver gradvist mere begrænset med finere fiberfordelinger, og derfor anbefales en TEM-måling (transmission electron microscope), hvis mediandiameteren er under 0,5 μm.

▼M1

1.4. Principper for testmetoden

Der udtages en række repræsentative kerneprøver fra fibertæppet eller fra de løse bulkfibre. Bulkfibrene afkortes i en knusningsproces, hvorefter der spredes en repræsentativ delprøve i vand. Der udtages måleprøver, der filtreres gennem et polykarbonatfilter med en porestørrelse på 0,2 µm, hvorefter de forberedes til undersøgelse i scanning-elektronmikroskop (SEM-teknologi). Fiberdiametrene måles ved en skærmforstørrelse på x 10 000 eller højere ([1]) ved hjælp af en linjeskæringspunktmetode for at give et objektivt estimat af mediandiameteren. Det laveste 95 % konfidensinterval (baseret på en en-sidet test) beregnes for at give et estimat af den laveste værdi af materialets geometriske middelfiberdiameter.

1.5. Beskrivelse af testmetoden

1.5.1. **Sikkerhedsforanstaltninger**

Medarbejdernes eksponering for luftbårne fibre bør minimeres, og der bør anvendes aftræksskab eller handskekasse ved håndtering af tørre fibre. Der bør gennemføres periodisk overvågning af medarbejdernes eksponering med henblik på at vurdere effektiviteten af de anvendte kontrolmetoder. Ved arbejde med MMMF'er skal der bæres engangshandsker for at reducere hudirritation og for at forebygge krydskontaminering.

1.5.2. **Apparatur og udstyr**

— presse og matricer (der kan producere 10 MPa)

— polykarbonat-kapillærfilter med en porestørrelse på 0,2 µm (25 mm diameter)

— membranfilter i ester-cellulose med en porestørrelse på 5 µm til brug som backing-filter

— apparatur til glasfiltrering (eller engangsfiltreringssystemer), der passer til filtre med en diameter på 25 mm (f.eks. Millipore glas-mikroanalysesæt, type nr. XX10 025 00)

— frisk destilleret vand, der er filtreret gennem et filter med en porestørrelse på 0,2 µm for at fjerne mikroorganismer

— sputter-coater med guld eller guld/palladium target

— scanning elektronmikroskop med en opløsning ned til 10 nm og med forstørrelse x 10 000

— diverse: spatler, skalpelblade type 24, pincetter, SEM-rør, carbon-lim eller carbon-klæbebånd, silver-dag

— ultralydsonde eller bordmonteret ultralydsbad

— kerneprøvebor eller propbor til udtagelse af kerneprøver af MMMF-tæppe.

([1]) Denne forstørrelsesværdi gælder for 3 µm fibre. For 6 µm fibre vil en forstørrelse på × 5 000 være mere passende.

▼M1

1.5.3. **Testprocedure**

1.5.3.1. *Prøveudtagning*

Til tæpper og måtter anvendes der et 25 mm kerneprøvebor eller propbor til udtagning af stikprøver af tværsnittet. De bør være jævnt fordelt over hele bredden af et kort stykke tæppe eller udtages fra tilfældige områder, hvis der er lange tæppelængder til rådighed. Man kan anvende det samme udstyr til udtagning af tilfældige stikprøver fra løse fibre. Hvis det er muligt, skal der udtages seks stikprøver for at afspejle lokale variationer i bulkmaterialet.

De seks kerneprøver knuses med et pressestempel på 50 mm diameter ved 10 MPa. Materialet blandes med spatel og presses igen ved 10 MPa. Endelig fjernes materialet fra pressen og opbevares i en lukket glasflaske.

1.5.3.2. *Behandling af stikprøver*

Hvis det er nødvendigt, kan det organiske bindemiddel fjernes ved at anbringe fibrene i en ovn ved 450 °C i ca. en time.

Ved hjælp af Cone-and-Quarter-teknikken opdeles stikprøven (dette skal udføres i et støvskab).

Med en spatel tilsættes en lille mængde (< 0,5 g) af stikprøven til 100 ml frisk destilleret vand, der er filtreret gennem et 0,2 μm membranfilter (alternative former for ultra-rent vand kan også bruges, hvis de har vist sig tilfredsstillende). Prøven dispergeres omhyggeligt ved hjælp af en ultralyd-sonde med en effekt på 100 W, der er indstillet, så der opstår kavitation. (Hvis der ikke kan tilvejebringes en sonde, kan følgende metode anvendes: Ryst og vend i 30 sekunder; derefter ultralydsbehandling i bordmonteret ultralydsbad i fem minutter, og endelig skal der igen rystes og vendes i 30 sekunder).

Umiddelbart efter dispersion af fibrene udtages der et antal måleprøver (f.eks. tre måleprøver på 3, 6 og 10 ml) med en pipette med stor åbning (kapacitet: 2-5 ml).

Hver delprøve vacuumfiltreres gennem et 0,2 μm polykarbonatfilter med et MEC backing-filter med en porestørrelse på 5 μm og med en 25 mm glasfiltertragt med cylindrisk beholder. Der hældes ca. 5 ml filtreret destilleret vand i tragten, og delprøven tilføres derefter langsomt vandet med pipette, idet pipettespidsen holdes under væskeoverfladen. Pipette og beholder skal gennemskylles omhyggeligt efter afpipetteringen, idet tynde fibre har en tendens til at samles på overfladen.

Filtret fjernes forsigtigt og tages af fra backing-filtret, inden det sættes til tørre i en beholder.

▼**M1**

Med en vippende bevægelse udskæres et kvart eller et halvt filterudsnit af det filtrerede bundfald ved hjælp af et skalpelblad type 24. Udskæringen anbringes forsigtigt på en SEM-stub ved hjælp af en klæbende carbon-tab eller carbon-lim. Der skal påsættes Silver-dag mindst tre steder for at optimere den elektriske kontakt på filterkanterne og på stubben. Når den påførte lim/silver-dag er tør, sputtercoates ca. 50 nm guld eller guld/palladium på overfladen af bundfaldet.

1.5.3.3. *Kalibrering og betjening af SEM*

1.5.3.3.1. Kalibrering

SEM-kalibrering bør kontrolleres mindst en gang om ugen (og helst hver dag) ved hjælp af et Certified Calibration Grid. Kalibreringen bør kontrolleres i forhold til en certificeret standard. Hvis den målte værdi (SEM) ikke ligger inden for ± 2 % af den certificerede værdi, skal SEM-kalibreringen gentages eller justeres.

SEM skal kunne arbejde med mindst en synlig minimumdiameter på 0,2 μm ved hjælp af en reel stikprøvematrix ved en forstørrelse på x 2 000.

1.5.3.3.2. Betjening

SEM skal arbejde ved 10 000 forstørrelse ([1]) og indstilles til at give en god opløsning med et acceptabelt billede ved langsomme scan-rates, f.eks. 5 sekunder pr. frame. Selv om betjeningen af forskellige SEM'er kan variere noget, så gælder det generelt, at man for at opnå den bedste synlighed og opløsning ved materialer med relativt lav atomvægt bør anvende stigende spændinger på 5-10 keV og indstille apparaturet til lille punktstørrelse og kort arbejdsafstand. Da man arbejder lineært gennem materialet, skal man vælge en 0^{o} hældning for at minimere genfokusering eller, hvis SEM'en er udstyret med et eucentrisk trin, skal denne arbejdsafstand anvendes. Der kan vælges en lavere forstørrelse, hvis materialet ikke indeholder små (diameter) fibre, og fiberdiameteren er stor (> 5 μm).

1.5.3.4. *Størrelsesvurdering*

1.5.3.4.1. Undersøgelse ved lille forstørrelse til vurdering af stikprøven

Først skal stikprøven undersøges ved lille forstørrelse for at afdække eventuel sammenklumpning af store fibre og for at vurdere fibertætheden. Hvis der konstateres for stor sammenklumpning, anbefales det, at der forberedes en ny prøve.

Af hensyn til den statistiske nøjagtighed er det nødvendigt at måle et minimumsantal fibre. Ligeledes er høj fibertæthed at foretrække, da undersøgelse af tomme felter er tidskrævende og uden værdi for analysen. Hvis filtret derimod er overbelastet, er det svært at måle alle målbare fibre, og desuden risikerer man ikke at få målt de små fibre, da de let ligger skjult af de større fibre.

([1]) For 3 μm fibres vedkommende, se forrige note.

▼**M1**

En systematisk fejl i retning af en for høj værdi af LWGMD kan optræde som følge af fibertætheder på over 150 fibre pr. millimeter lineært snit. På den anden side vil lave fiberkoncentrationer forøge analysetiden, og derfor kan det ofte bedre betale sig at forberede en prøve med en tæthed, der ligger nær optimal tæthed, end at blive ved med at tælle på filtre med lave koncentrationer. Den optimale fibertæthed vil give et gennemsnit på ca. et eller to tælbare fibre pr. felt ved 5 000 forstørrelse. Den optimale tæthed vil imidlertid afhænge af størrelsen (diameteren) af fibrene. Derfor skal analysemedarbejderen støtte sig til en ekspertvurdering for at kunne afgøre, om fibertætheden er nær ved det optimale eller ej.

1.5.3.4.2. Længdevægtning af fiberdiametre

Det er kun de fibre, der rører (eller ligger på tværs af) en (uendelig) tynd linje afsat på SEM'ens skærm, der tælles. Derfor er der afsat en horisontal (eller vertikal) linje tværs gennem skærmens centrum.

Alternativt er der afsat et enkelt punkt i skærmens centrum, hvorefter der foretages en kontinuerlig scanning i en retning på tværs af filtret. Enhver fiber, der har et formatforhold større end 3:1, og som berører eller går gennem dette punkt, bliver underkastet måling af diameter, hvorefter resultatet registreres.

1.5.3.4.3. Størrelsesvurdering af fibre

Det anbefales, at der måles mindst 300 fibre. Hver fiber måles kun én gang ved skæringspunktet med den linje eller det punkt, der er afsat på billedet (eller tæt ved skæringspunktet, hvis fiberkanterne er skjult). Hvis man støder på fibre med uensartede tværsnit, skal man foretage en måling, der repræsenterer fiberens gennemsnitsdiameter. Man skal være meget omhyggelig med at udpege kanten og måle den korteste afstand mellem fiberens kanter. Størrelsesvurderingen kan ske online eller offline på lagrede billeder eller fotos. Det anbefales at bruge systemer til halvautomatisk billedmåling, der henter data direkte ind i et regneark, da de sparer tid og udelukker afskriftsfejl. Endelig automatiserer de beregningerne.

Enderne af lange fibre skal undersøges ved lille forstørrelse for at sikre, at de ikke krummer tilbage i målefeltet og derved måles flere gange.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Fiberdiametre følger almindeligvis ikke en normalfordeling. Hvis man gennemfører en log-transformation, er det dog muligt at opnå en fordeling, der ligger nær ved normalfordelingen.

Den aritmetiske middelværdi (mean lnD) og standardafvigelsen (SD_{lnD}) af den naturlige logaritme (lnD) til n fiberdiametre (D) beregnes.

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardafvigelsen divideres med kvadratroden af antallet af målinger (n) for at nå frem til standardfejlen (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

To gange standardfejlen trækkes fra middelværdien, og eksponentialfunktionen af denne værdi (middelværdi minus to standardfejl) beregnes for at få den geometriske middelværdi minus to geometriske standardfejl.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— værdien af LWGMD-2SE

— enhver afvigelse og især de afvigelser, der vil kunne påvirke præcisionen eller nøjagtigheden af resultaterne med tilhørende behørigt begrundede tilfælde.

4. **REFERENCER**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Februar 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23. FORDELINGSKOEFFICIENT (1-OCTANOL/VAND): SLOW-STIRRING-METODEN

INDLEDNING

1. Denne metode svarer til OECD Test Guideline (TG) 123 (2006). 1-Octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{OW}) er for P_{OW}-værdier svarende til log P_{OW} på indtil 8,2 blevet bestemt nøjagtigt med slow-stirring-metoden (1). Metoden er derfor velegnet til direkte eksperimentel bestemmelse af P_{OW} for stærkt hydrofobe stoffer.

2. Andre metoder, der beskriver fremgangsmåden til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{OW}), er »shake-flask«-metoden (2) og bestemmelse af P_{OW} ud fra retentionsmønsteret ved omvendt-fase HPLC (3). »Shake-flask«-metoden er tilbøjelig til at give artefakter på grund af overførsel af mikrodråber af octanol til den vandige fase. For stigende P_{OW} vil tilstedeværelse af sådanne dråber i den vandige fase medføre stadig større overvurdering af teststoffets koncentration i vandet. Metoden kan derfor kun anvendes på stoffer med log $P_{OW} < 4$. I den anden metode anvendes pålidelige, direkte bestemte P_{OW}-værdier til kalibrering af sammenhængen mellem HPLC-retentionsmønsteret og de målte P_{OW}-værdier. Der er desuden udarbejdet et udkast til en OECD-guideline til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienterne for ioniserbare stoffer (4), men den bør ikke anvendes.

3. Denne metode er udviklet i Nederlandene. Præcisionen af de beskrevne metoder er valideret og optimeret i en ringtest med deltagelse af 15 laboratorier (5).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Signifikans og anvendelse

4. For inerte organiske stoffer er der konstateret en meget signifikant sammenhæng mellem stoffernes 1-octanol/vand-fordelingskoefficient (P_{OW}) og bioakkumuleringen i fisk. Desuden er P_{OW} påvist at være korreleret såvel med toksicitet over for fisk som med deres sorption af kemikalier til faste stoffer, som f.eks. jord og sedimenter. En omfattende gennemgang af disse sammenhænge er givet i reference (6).

5. En lang række forskellige sammenhænge er fastlagt mellem 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten og andre miljøtoksikologisk og miljøkemisk relevante stofegenskaber. I konsekvens heraf er 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten blevet en nøgleparameter såvel ved vurdering af kemikaliers miljøfarlighed som ved forudsigelse af deres skæbne i miljøet.

Anvendelsesområde

6. Slow-stirring-metoden antages at nedsætte dannelsen af mikrodråber af 1-octanol i vandfasen. Derved undgås den overvurdering af teststofkoncentrationen i den vandige fase, der skyldes teststofmolekyler knyttet til sådanne dråber. Slow-stirring-metoden er derfor særlig velegnet til bestemmelse af P_{OW} for stoffer med en forventet log P_{OW}-værdi på 5 eller derover, hvor shake-flask-metoden (2) er tilbøjelig til at give fejlagtige resultater.

▼M4

DEFINITIONER OG ENHEDER

7. Et stofs fordelingskoefficient mellem vand og et lipofilt opløsningsmiddel (1-octanol) karakteriserer kemikaliets ligevægtsfordeling mellem de to faser. Fordelingskoefficienten mellem vand og 1-octanol (P_{OW}) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne af teststoffet i 1-octanol mættet med vand (C_O) og i vand mættet med 1-octanol (C_W).

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

Den er et koncentrationsforhold og er derfor dimensionsløs. Den angives oftest ved sin titalslogaritme (log P_{OW}). P_{OW} er temperaturafhængig, og rapporterede data skal derfor omfatte måletemperaturen.

METODENS PRINCIP

8. Til bestemmelse af fordelingskoefficienten bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden ved konstant temperatur. Derefter bestemmes teststoffets koncentration i de to faser.

9. Den her foreslåede slow-stirring-metode mindsker de eksperimentelle vanskeligheder, der er forbundet med dannelse af mikrodråber, når shake-flask-metoden benyttes. I slow-stirring-metoden bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden i en termostatstyret reaktionsbeholder med omrører. Transporten af stoffer mellem faserne fremskyndes ved omrøring. Ved omrøringen opstår der en vis turbulens, der øger stoftransporten mellem 1-octanol og vand, uden at der dannes mikrodråber (1).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

10. Da tilstedeværelse af andre stoffer end teststoffet kan tænkes at have indflydelse på teststoffets aktivitetskoefficient, skal teststoffet afprøves i ren form. Den reneste gængse kvalitet af teststoffet til bestemmelsen af fordelingen 1-octanol/vand skal anvendes.

11. Denne metode finder anvendelse på rene stoffer, der ikke dissocierer eller associerer, og som ikke udviser nævneværdig overfladeaktivitet. Den kan anvendes til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten for sådanne stoffer og for blandinger. Når metoden anvendes på blandinger, afhænger de målte fordelingsforhold 1-octanol/vand dels af den testede blandings kemiske sammensætning, dels af sammensætningen af den elektrolytblanding, der anvendes som vandig fase. Forudsat der træffes supplerende foranstaltninger, kan metoden også anvendes på stoffer, der dissocierer eller associerer (afsnit 12).

12. Som følge af de mange forskellige ligevægte, der optræder ved fordelingen mellem 1-octanol/vand af dissocierende forbindelser som organiske syrer og phenoler, organiske baser og metalorganiske forbindelser, er fordelingsforholdet i 1-octanol/vand en betinget konstant, der afhænger stærkt af elektrolytsammensætningen (7) (8). Bestemmelse af fordelingsforholdet i 1-octanol/vand kræver derfor styring og rapportering af pH og elektrolytsammensætning i testen. Vurdering af sådanne fordelingsforhold kræver ekspertviden. Ud fra størrelsen af dissociationskonstanterne må der vælges passende pH-værdier, således at der bestemmes et fordelingsforhold for hver ioniseringstilstand. Til testning af metalorganiske forbindelser skal de anvendte buffere være ikke-kompleksdannende (8). På grundlag af kendskabet til vandige opløsningers kemi (kompleksdannelseskonstanter, dissociationskonstanter) må testbetingelserne vælges, så at det er muligt at fastlægge, i hvilke former teststoffet optræder i den vandige fase. Ionstyrken skal holdes identisk i alle test ved anvendelse af en baggrundselektrolyt.

▼M4

13. Teststoffer med lav vandopløselighed eller høj P_{OW} kan volde vanskeligheder, fordi koncentrationen i vandfasen bliver meget lav og derfor vanskeligt kan bestemmes nøjagtigt. Det beskrives i metoden, hvordan dette problem gribes an.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

14. Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet eller bedre. Det anbefales, at der enten anvendes umærket teststof med kendt kemisk sammensætning og helst mindst 99 % renhed eller radioaktivt mærket teststof med kendt kemisk sammensætning og radiokemisk renhed. Anvendes der radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald. Hvis der anvendes radioaktivt mærket teststof, skal analysemetoden være specifik for det pågældende kemiske stof for at sikre, at den målte radioaktivitet hænger direkte sammen med teststoffet.

15. Log P_{OW} kan enten bestemmes ved hjælp af gængs software til bestemmelse af log P_{OW} eller ud fra forholdet mellem opløselighederne i de to opløsningsmidler.

16. Før man udfører en test til bestemmelse af P_{OW} med slow-stirring-metoden, skal der foreligge følgende oplysninger om teststoffet:

a) strukturformel

b) egnede analysemetoder til bestemmelse af stoffets koncentration i vand og 1-octanol

c) dissociationskonstant(er) for ioniserbare stoffer (OECD Guideline 112 (9))

d) vandopløselighed (10)

e) abiotisk hydrolyse (11)

f) umiddelbar bionedbrydelighed (12)

g) damptryk (13).

BESKRIVELSE AF METODEN

Udstyr og apparatur

17. Der kræves sædvanligt laboratorieudstyr, herunder specielt følgende:

— magnetomrørere og teflonbelagte magneter til omrøring af vandfasen

— egnet analyseudstyr til bestemmelse af teststoffets koncentration i det forventede koncentrationsområde

— omrørerbeholder med bundhane. Afhængigt af den skønnede P_{OW}-værdi og detektionsgrænsen (LOD) for teststoffet må det overvejes at anvende en reaktionsbeholder med kapacitet på mere end én liter, men med samme geometri, for at der kan udtages et tilstrækkeligt volumen vand til kemisk ekstraktion og analyse. Derved bliver koncentrationerne i det vandige ekstrakt højere, og den analytiske bestemmelse dermed mere pålidelig. En tabel med anslåede værdier af det minimale nødvendige volumen, detektionsgrænsen for teststoffet, dets anslåede log P_{OW} og dets vandopløselighed er givet i tillæg 1. Tabellen er baseret på sammenhængen mellem log P_{OW} og forholdet mellem opløseligheden i octanol og vand som angivet af Pinsuwan et al. (14):

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

▼M4

hvor:

$SR = S_{oct}/S_w$ (i molaritet)

og på den af Lyman (15) angivne relation til forudsigelse af vandopløselighed. En vandopløselighed, der er beregnet med ligningen i tillæg 1, må anses for et foreløbigt skøn. Det bemærkes, at det står brugeren frit at foretage en beregning af vandopløseligheden ved hjælp af enhver relation, der måtte anses for bedre til at beskrive sammenhængen mellem hydrofobicitet og opløselighed. For faste stoffer anbefales det f.eks. at lade smeltepunktet indgå i skønnet over opløseligheden. Hvis en modificeret ligning anvendes, må det efterprøves, at ligningen til beregning af opløseligheden i octanol stadig kan anvendes. Tillæg 2 indeholder en skematisk tegning af en omrørerbeholder med glaskappe og et volumen på ca. en liter. Beholderen i tillæg 2 har vist sig at have hensigtsmæssige proportioner, som bør bibeholdes, hvis der anvendes udstyr af anden størrelse

— en anordning til at fastholde en konstant temperatur er ubetinget nødvendig under slow-stirring-testen.

18. Beholderen skal være udført i inert materiale, så der kan ses bort fra adsorption til beholderens overflade.

Fremstilling af testopløsningerne

19. Til bestemmelsen af P_{OW} skal der anvendes 1-octanol af reneste handelskvalitet (over 99 %). Rensning af den anvendte 1-octanol ved ekstraktion med syre, base og vand og efterfølgende tørring anbefales. Derudover kan 1-octanol renses ved destillation. Til fremstilling af standardopløsningerne af teststofferne skal der bruges renset 1-octanol. Vandet, der benyttes til bestemmelse af P_{OW}, skal enten være destilleret i glas eller kvarts, hidrøre fra et rensningssystem eller være af HPLC-kvalitet. Destilleret vand skal filtreres gennem et 0,22 μm filter, og der skal indgå blindprøver for at kontrollere, at der ikke er urenheder, der kan gribe forstyrrende ind i bestemmelsen af teststoffet i de koncentrerede ekstrakter. Hvis der anvendes et glasfiberfilter, skal det renses ved opvarmning til 400 °C i mindst tre timer.

20. Inden testen mættes de to faser gensidigt ved ækvilibrering i en tilstrækkelig stor beholder. Dette opnås ved langsom omrøring (slow-stirring) af tofasesystemet i to døgn.

21. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Fordelingskoefficienten 1-octanol/vand bestemmes i fortyndede opløsninger i 1-octanol og vand. Koncentrationen af teststoffet bør derfor ikke være over 70 % af opløseligheden, og ikke over 0,1 M i nogen af faserne (1). De anvendte 1-octanol-opløsninger skal være fri for opslæmmede faste partikler af teststof.

22. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Hvis den anslåede værdi af P_{OW} er over fem, skal det sikres, at de i testen anvendte 1-octanol-opløsninger er fri for opslæmmede partikler af teststoffet. Til dette formål benyttes følgende fremgangsmåde til kemikalier med en anslået log P_{OW}-værdi > 5:

— Teststoffet opløses i 1-octanol (mættet med vand).

▼M4

— Opløsningen henstår så længe, at opslæmmede partikler når at bundfælde sig. Mens bundfældelsen står på, overvåges koncentrationen af teststoffet.

— Når de målte koncentrationer i 1-octanol-opløsningen er blevet stabile, fortyndes stamopløsningen med et passende volumen 1-octanol.

— Koncentrationen af den fortyndede stamopløsning måles. Hvis den målte koncentration er i overensstemmelse med den foretagne fortynding, kan den fortyndede stamopløsning anvendes til slow-stirring-testen.

Ekstraktion og analyse af prøver

23. Til assay af teststoffet skal der anvendes en valideret analysemetode. De for analysen ansvarlige skal dokumentere, at koncentrationerne både i den vandmættede 1-octanol-fase og i den 1-octanol-mættede vandfase er over kvantificeringsgrænsen for den anvendte analysemetode gennem hele testen. Når det er nødvendigt at bruge ekstraktion, skal genfindingen af teststoffet ved analysen af vandfasen og 1-octanol-fasen bestemmes inden testen. Analysesignalet skal korrigeres for blindværdi, og det skal sikres, at der ikke kan overføres analysand fra én prøve til en anden.

24. På grund af de ret lave koncentrationer i vandfasen af et hydrofobt teststof vil det antagelig være nødvendigt at ekstrahere vandfasen med et organisk opløsningsmiddel og forkoncentrere ekstrakten inden analyse. Af samme grund er det nødvendigt at reducere et eventuelt indhold i blindprøverne. Det kræver, at der anvendes opløsningsmidler af høj renhed, fortrinsvis opløsningsmidler til reststofanalyse. Derudover vil omhyggelig rensning af det anvendte glasapparatur(f.eks. vask med opløsningsmiddel eller opvarmning til høj temperatur) medvirke til at undgå krydskontaminering.

25. Et skøn over log P_{OW} kan fås af et beregningsprogram eller ved en ekspertvurdering. Hvis værdien er over seks, skal blindkorrektioner og overførsel af analysand nøje overvåges. Hvis den anslåede værdi af log P_{OW} er over seks, er det desuden obligatorisk at bruge en surrogatstandard til korrektion for genfinding, for at der kan opnås en høj forkoncentrationsfaktor. Til tilnærmet beregning af en log P_{OW}-værdi findes der på markedet forskellige softwareprogrammer [1], f.eks. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) og ACD log P (19). Metoderne til tilnærmet beregning er beskrevet i referencerne (20-22).

26. Kvantificeringsgrænserne (LOQ) for bestemmelse af teststoffet i 1-octanol og vand fastlægges med anerkendte metoder. Som tommelfingerregel kan metodens kvantificeringsgrænse sættes til den koncentration i vand eller 1-octanol, der frembringer et signal/støjforhold på 10. Der skal vælges en passende metode til ekstraktion og forkoncentrering, og genfindingsværdierne ved analysen skal ligeledes angives. Forkoncentreringsfaktoren skal vælges, så der opnås et signal af den nødvendige størrelse ved den analytiske bestemmelse.

[1] Denne oplysning er kun til orientering for brugerne. Andre tilsvarende softwareprogrammer kan anvendes, hvis det kan dokumenteres, at de giver de samme resultater.

▼M4

27. På grundlag af analysemetodens parametre og de forventede koncentrationer bestemmes den omtrentlige prøvemængde, der er nødvendig for at få en nøjagtig bestemmelse af teststofkoncentrationen. Det bør undgås at tage vandprøver, der er for små til at give et tilstrækkeligt analysesignal. Ligeledes bør det undgås at tage vandprøver, der er alt for store, da der i så fald kan være for lidt vand tilbage til det nødvendige mindste antal analyser (n = 5). I tillæg 1 er angivet det minimale prøvevolumen som funktion af beholdervolumen, detektionsgrænse for teststoffet og opløselighed af teststoffet.

28. Kvantificering af teststoffet foretages ved sammenholdelse med kalibreringskurverne for den pågældende forbindelse. Koncentrationerne i de analyserede prøver skal ligge i intervallet mellem den højeste og den laveste koncentration af standard.

29. For teststoffer med en anslået log P_{OW}-værdi højere end seks skal der før ekstraktion tilsættes en surrogatstandard til vandet for at registrere tab under ekstraktion og forkoncentrering af vandprøverne. For at der kan korrigeres nøjagtigt for genfindingsgraden, skal surrogaternes egenskaber nøje svare til teststoffets eller være identiske dermed. Til det formål bør der fortrinsvis anvendes (stabile) isotopmærkede analoger af de undersøgte stoffer (f.eks. deuterium- eller ^{13}C-mærkede). Hvis det ikke er muligt at anvende stabile, isotopmærkede analoger, f.eks. ^{13}C eller ^{2}H, skal det ud fra pålidelige litteraturdata godtgøres, at surrogaternes fysisk-kemiske egenskaber ligger meget tæt på teststoffets. Under væske-væske ekstraktion af vandfasen kan der dannes emulsioner. Emulsionsdannelsen kan begrænses ved tilsætning af salt og ved at lade emulsionen sætte sig natten over. De anvendte metoder til ekstraktion og forkoncentrering af prøverne skal beskrives.

30. Prøverne af 1-octanolfasen kan om nødvendigt fortyndes med et passende opløsningsmiddel inden analyse. Desuden anbefales brug af surrogatstandarder til korrektion for genfindingsgraden for stoffer, som har udvist stor variation ved genfindingsforsøgene (relativ standardafvigelse > 10 %).

31. Analysemetoden skal beskrives i detaljer. Herunder angives ekstraktionsmetode, forkoncentrerings- og fortyndingsfaktor, instrumentparametre, kalibreringsrutine, kalibreringsområde, analytisk genfinding af teststoffet i vand, tilsætning af surrogatstandarder til korrektion for genfindingsgrad, blindværdier, detektionsgrænser og kvantificeringsgrænser.

Testens udførelse

Optimale volumenforhold 1-octanol/vand

32. Ved valg af volumenet af vand og volumenet af 1-octanol skal følgende forhold tages i betragtning: kvantificeringsgrænsen i 1-octanol og vand, de forkoncentreringsfaktorer, der anvendes på vandprøverne, de udtagne prøvevolumener af 1-octanol og vand samt de forventede koncentrationer. Af hensyn til forsøgets udførelse skal volumenet af 1-octanol i slow-stirring-systemet vælges, så 1-octanol-laget er tilstrækkelig tykt (> 0,5 cm) til, at der kan tages prøver af 1-octanol-fasen uden at forstyrre denne.

33. Til bestemmelse af forbindelser med log P_{OW} på 4,5 og derover anvendes typisk et forhold mellem faserne på 20-50 ml 1-octanol og 950-980 ml vand i en beholder på én liter.

▼**M4**

Testbetingelser

34. Under testen skal reaktionsbeholderen være termostateret med en temperaturvariation på under 1 °C. Assayet skal udføres ved 25 °C.

35. Testsystemet skal være beskyttet mod dagslys, enten ved brug af mørkekammer eller ved indpakning af reaktionsbeholderen i alufolie.

36. Testen skal (så vidt muligt) udføres i støvfrit miljø.

37. Systemet 1-octanol-vand omrøres, til det har nået ligevægt. Der foretages et indledende pilotforsøg, hvor ækvilibreringsperioden bestemmes ved slow-stirring metoden med regelmæssig prøveudtagning af vand og 1-octanol. Der skal gå mindst fem timer mellem prøveudtagningerne.

38. Hver P_{OW}-bestemmelse skal ske ved hjælp af mindst tre uafhængige slow-stirring-test.

Bestemmelse af ækvilibreringstiden

39. Ligevægt antages at være nået, når afbildning af koncentrationsforholdet i 1-octanol/vand mod tiden i fire tidspunkter resulterer i en regressionslinje med en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra nul ved et p-niveau på 0,05. Der skal ækvilibreres i mindst ét døgn, før prøvetagningen påbegyndes. For stoffer med en anslået log P_{OW}-værdi på mindre end fem kan prøveudtagning som tommelfingerregel finde sted på dag to og tre. For mere hydrofobe forbindelser kan det være nødvendigt med længere ækvilibreringstid. For en forbindelse med en log P_{OW} på 8,23 (decachlorbiphenyl) var 144 timer tilstrækkeligt til ækvilibrering. Opnåelse af ligevægt vurderes ved gentagne prøvetagninger fra samme forsøgsbeholder.

Start af testen

40. Ved testens start fyldes reaktionsbeholderen med vand mættet med 1-octanol. Det afventes, at blandingen antager den termostaterede temperatur.

41. Den ønskede mængde teststof (opløst i det nødvendige volumen 1-octanol mættet med vand) tilsættes forsigtigt til reaktionsbeholderen. Dette er et afgørende trin i testen, da det er nødvendigt at undgå turbulent opblanding af de to faser. Til dette formål kan 1-octanol-fasen langsomt afpipetteres op mod væggen af testbeholderen, tæt på vandoverfladen. Den vil derved flyde ned ad glasvæggen og danne en film på oversiden af vandfasen. Dekanter aldrig 1-octanol direkte i kolben; undgå, at der drypper 1-octanol direkte ned i vandet.

42. Efter start af omrøringen skal omrøringshastigheden øges langsomt. Hvis omrørermotoren ikke kan indstilles passende, må brug af en transformator overvejes. Omrøringshastigheden skal indstilles, så der dannes en hvirvel med en dybde på 0,5 til højst 2,5 cm i grænsefladen mellem vand og 1-octanol. Hvis hvirvlens dybde er over 2,5 cm, skal omrøringshastigheden mindskes, da der ellers kan dannes mikrodråber af 1-octanol i vandfasen, hvilket vil medføre overvurdering af teststofkoncentrationen i vandet. Den anbefalede maksimale omrøringshastighed svarende til 2,5 cm er baseret på resultaterne af ring-testen (5). Den repræsenterer et kompromis mellem hurtigst mulig ækvilibrering og begrænsning af dannelsen af mikrodråber af 1-octanol.

▼**M4**

Prøveudtagning og behandling af prøverne

43. Ved prøvetagning skal omrøreren være afbrudt, og bevægelsen i væskerne skal være ophørt. Når prøverne er taget, startes omrøreren igen langsomt som ovenfor beskrevet, hvorefter hastigheden øges gradvis.

44. Prøver af vandfasen tages fra en hane i bunden af reaktionsbeholderen. Dødvolumenet af vand i hanerne skal altid kasseres (i den i tillæg 2 viste beholder er det ca. 5 ml). Vandet i hanerne bliver ikke omrørt og er derfor ikke i ligevægt med hovedmængden. Notér volumenet af vandprøverne, og sørg for, at indholdet af teststof i det kasserede vand medregnes ved opstilling af massebalancen. Fordampningstabet skal minimeres ved at lade vandet løbe roligt ned i skilletragten, så laget af vand/1-octanol ikke forstyrres.

45. Prøverne af 1-octanol fås ved at udtage en lille aliquot (ca. 100 µl) fra 1-octanol-laget med en 100 mikroliter sprøjte udført helt i glas-metal. Der skal udvises forsigtighed for at ikke at forstyrre grænsefladen. Volumenet af den udtagne væskeprøve noteres. En lille aliquot er tilstrækkeligt, da prøven af 1-octanol bliver fortyndet.

46. Overflødige overførselstrin for prøverne bør undgås. Der benyttes derfor vejning til bestemmelse af prøvevolumenet. For vandprøvernes vedkommende kan dette ske ved opsamling af vandprøven i en skilletragt, der i forvejen indeholder det nødvendige volumen opløsningsmiddel.

DATA OG RAPPORTERING

47. I denne metode bestemmes P_{OW} ved tre slow-stirring-test (tre forsøgsenheder) med det undersøgte stof under identiske betingelser. Den regressionslinje, der anvendes til påvisning af ligevægt, skal være baseret på resultaterne af mindst fire på hinanden følgende bestemmelser af C_O/C_W. Derved kan variansen beregnes som et mål for usikkerheden på det beregnede gennemsnit for hver forsøgsenhed.

48. P_{OW} kan karakteriseres ved variansen af de data, der opnås for hver forsøgsenhed. På grundlag heraf beregnes P_{OW} som det vægtede gennemsnit af resultaterne fra de enkelte forsøgsenheder. Ved beregningen vægtes resultaterne for forsøgsenhederne med deres reciprokke varians. Derved opnås, at data med stor variation (udtrykt ved variansen) og dermed mindre pålidelighed får mindre indflydelse på resultatet end data med lille varians.

49. Analogt hermed beregnes den vægtede standardafvigelse. Denne karakteriserer repeterbarheden af målingen af P_{OW}. Hvis den vægtede standardafvigelse er lav, har P_{OW}-bestemmelsen en høj grad af repeterbarhed inden for samme laboratorium. Den formelle statistiske behandling af data er beskrevet nedenfor.

▼M4

Behandling af resultater

Påvisning af opnåelse af ligevægt

50. For hvert prøvetagningstidspunkt beregnes logaritmen til forholdet mellem teststoffets koncentration i 1-octanol og vand (log (C_O/C_W)). Opnåelse af kemisk ligevægt påvises ved afbildning af dette forhold mod tiden. Når denne kurve går over i et plateau bestående af mindst fire på hinanden følgende tidspunkter, er ligevægt nået, og stoffet er reelt opløst i 1-octanol. Hvis ikke, må testen fortsættes, indtil fire på hinanden følgende tidspunkter giver en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra 0 ved et p-niveau på 0,05 som tegn på, at C_O/C_W er uafhængig af tiden.

Beregning af log P_{OW}

51. Log P_{OW} for den pågældende forsøgsenhed beregnes som det vægtede gennemsnit af log C_o/C_w for den del af kurven over log C_o/C_w som funktion af tiden, hvor ligevægt er påvist at være indtrådt. Det vægtede gennemsnit beregnes ved at vægte data med den reciprokke varians, så indflydelsen af data på slutresultatet bliver omvendt proportional med usikkerheden på data.

Gennemsnitlig log P_{OW}

52. Gennemsnitsværdien af log P_{OW} for forskellige forsøgsenheder beregnes som gennemsnittet af resultaterne for de enkelte forsøgsenheder, vægtet med den pågældende varians.

Beregningen foretages således:

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

hvor:

$\log P_{OW,i}$ = værdien af log P_{OW} for den individuelle forsøgsenhed i

$\log P_{OW,Av}$ = det vægtede gennemsnit af de enkelte bestemmelser af log P_{OW}

w_i = den statistiske vægt, der tildeles værdien af log P_{OW} for den individuelle forsøgsenhed i

Den reciprokke varians af log $P_{OW,i}$ anvendes som w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. Fejlen på gennemsnittet af log P_{OW} beregnes som repeterbarheden af log C_O/C_W, bestemt i ligevægtsfasen i de enkelte forsøgsenheder. Den udtrykkes som den vægtede standardafvigelse på log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), der igen er et mål for fejlen på log $P_{OW,Av}$. Den vægtede standardafvigelse kan beregnes af den vægtede varians $var_{\log Pow,Av}$ på følgende måde:

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

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symbolet n er antal forsøgsenheder.

▼M4

Testrapport

54. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (som viser placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se afsnit 17)

— renhed (urenheder) af teststoffet

— for mærkede kemikalier, nominel renhed af radioaktiv mærkning samt molær aktivitet (hvis relevant)

— den foreløbige anslåede værdi af log P_{OW} og den metode, hvormed denne værdi er beregnet.

Testbetingelser:

— dato for testenes udførelse

— testtemperaturen

— volumen 1-octanol og vand ved testens start

— volumen af de udtagne prøver af 1-octanol og vand

— volumen 1-octanol og vand, der er tilbage i testbeholderne

— beskrivelse af forsøgsbeholdere og omrøringsforhold (den geometriske form af omrørermagneten og af forsøgsbeholderen, hvirvelhøjden i mm samt omrøringshastigheden, når denne kendes)

— de analysemetoder, der er anvendt til bestemmelse af teststoffet, og metodernes kvantificeringsgrænse

— prøvetagningstidspunkter

— pH af den vandige fase og, når pH justeres for ioniserbare molekyler, de anvendte buffere

— antal gentagelser.

Resultater:

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— de fundne koncentrationer af teststoffet i 1-octanol og vand som funktion af tiden

— opstilling af en massebalance

— temperatur og standardafvigelse, eller temperaturområde under testen

— regression af koncentrationsforholdet på tiden

— gennemsnitlig log $P_{ow,Av}$-værdi og standardfejlen herpå

— diskussion og fortolkning af resultaterne

▼M4

— eksempler på rådata for repræsentative analyser (alle rådata skal opbevares i henhold til GLP-normer), herunder genfindingsværdier for surrogater, antal niveauer anvendt ved kalibrering (sammen med kriterierne for korrelationskoefficienten for kalibreringskurven) og resultaterne af QA/QC

— når den foreligger: valideringsrapport for assaymetoden (angives under referencer).

LITTERATUR:

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

(2) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.

(3) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.

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

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

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

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

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

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

(10) Kapitel A.6 i dette bilag, Vandopløselighed.

(11) Kapitel C.7 i dette bilag, Nedbrydning — Abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH.

(12) Kapitel C.4 — del II til VII (Metode A til F) i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(13) Kapitel A.4 i dette bilag, Damptryk.

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

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

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

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

▼M4

Tillæg 1

Regneark til beregning af mindste vandvolumen, der er nødvendigt til detektion af teststoffer med forskellige log P_{OW}-værdier i vandig fase

Forudsætninger:

— Maksimumsvolumen af de enkelte aliquoter = 10 % af totalvolumenet; 5 aliquoter = 50 % af totalvolumenet.

— Teststofkoncentration = 0,7 × opløselighedenihverfase. Ved lavere koncentration skal der bruges større volumener.

— Anvendt volumen til bestemmelse af detektionsgrænse = 100 ml.

— Log P_{OW} mod log S_W og log P_{OW} mod SR (S_{OCT}/S_W) er rimelige fremstillinger af de sammenhænge, der gælder for teststofferne.

Beregning af S_w

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

Beregning af S_{oct}

log P_{ow}	ligning	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E + 04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E + 04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E + 04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E + 04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E + 05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E + 05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E + 05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E + 05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E + 05

▼**M4**

Total masse af teststof (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Beregning af volumener

Nødvendigt minimumsvolumen for H_2O-fasen ved hver LOD-koncentration

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

Nøgle til beregninger

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 1-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 2-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 5-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 10-liters ækvilibreringsbeholder.

Over 10 % af selv 10-liters ækvilibreringsbeholderen.

▼**M4**

Oversigt over nødvendigt volumen som funktion af vandopløselighed og log P_{ow}

Minimumsvolumen til H_2O-fasen ved hver LOD-koncentration (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

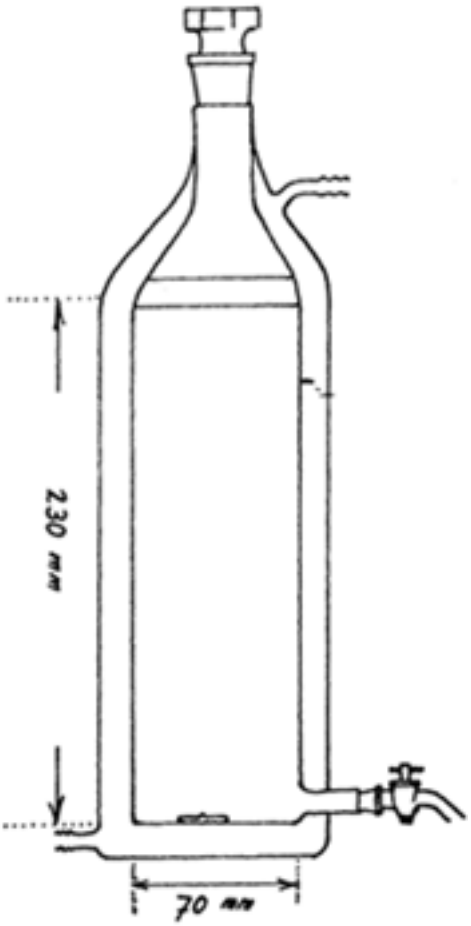
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen anvendt til LOD (l)		0,1					

▼M4

Tillæg 2

Eksempel på beholder med glaskappe til slow-stirring-test til bestemmelse af P_{OW}



▼M6

A.24. FORDELINGSKOEFFICIENT (N-OCTANOL/VAND), HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC)-METODEN

INDLEDNING

Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 117 (2004)

1. Fordelingskoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne af et stof, der er opløst i et tofasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler. I tilfælde af n-octanol og vand:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{vand}}}$$

Fordelingskoefficienten, som er et forhold mellem to koncentrationer, er dimensionsløs og opgives ofte som titalslogaritmen.

2. P_{ow} er en nøgleparameter i undersøgelser af kemiske stoffers skæbne i miljøet. Der har vist sig at være et stærkt signifikant forhold mellem P_{ow} for stoffers ikke-ioniserede form og bioakkumulering heraf i fisk. Det har desuden vist sig, at P_{ow} er en nyttig parameter i forudsigelsen af adsorption i jord og sedimenter og til bestemmelse af kvantitative struktur/aktivitetforhold for en lang række biologiske virkninger.

3. Det oprindelige forslag til denne testmetode var baseret på en artikel af C. V. Eadsforth og P. Moser (1). Udviklingen af testmetoden og OECD's sammenlignende laboratorieundersøgelse blev koordineret af Forbundsrepublikken Tysklands Umweltbundesamt i 1986 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

4. log P_{ow}-værdier i området – 2 til 4 (undertiden op til 5 og derover) ([1]) kan bestemmes eksperimentelt med rystekolbemetoden (kapitel A.8 i dette bilag, OECD Test Guideline 107). HPLC-metoden omfatter log P_{ow} i området 0 til 6 (1)(2)(3)(4)(5). Denne metode kan kræve en beregning af P_{ow} med henblik på valg af egnede referencestoffer og som underbygning for konklusioner draget af de data, der er genereret ved hjælp af testen. Beregningsmetoderne beskrives kort i tillægget til denne testmetode. HPLC-operationsformen er isokratisk.

5. P_{ow}-værdierne afhænger af miljøforholdene, såsom temperatur, pH, ionstyrke osv., og disse bør defineres i eksperimentet med henblik på korrekt fortolkning af P_{ow}-data. For så vidt angår ioniserbare stoffer, kan en alternativ metode blive tilgængelig (f.eks. udkastet til OECD's vejledning for den pH-metriske metode for ioniserede stoffer (6)). Udkastet til OECD's vejledning kan være egnet til at bestemme P_{ow} for disse ioniserbare stoffer, men i visse tilfælde er det mere hensigtsmæssigt at bruge HPLC-metoden ved en miljørelevant pH-værdi (se punkt 9).

([1]) En øvre grænse opstår som følge af behovet for at opnå en fuld separationsfase efter justering af fordelingsligevægten og inden udtagning af prøver til analyse. Hvis der udvises omhu, kan den øvre grænse udvides til højere $P_{ow\text{-værdier}}$.

▼M6

METODENS PRINCIP

6. Omvendt fase-HPLC udføres på analytiske kolonner pakket med en kommercielt tilgængelig fast fase indeholdende lange kulbrintekæder (f.eks. C8, C18), der er kemisk bundet til silica.

7. Et kemikalie, der indsprøjtes på en sådan kolonne, fordeles mellem den mobile opløsningsmiddelfase og den stationære kulbrintefase, efterhånden som den mobile fase transporterer det gennem kolonnen. Stoffernes retentionstid afhænger af deres kulbrinte/vand-fordelingskoefficient; hydrofile stoffer elueres først, og lipofile stoffer sidst. Retentionstiden beskrives ved kapacitetsfaktoren k, der er givet ved udtrykket:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

hvor t_R er teststoffets retentionstid, og t_0 er dødtiden, dvs. den tid det i gennemsnit tager et opløsningsmiddelmolekyle at komme gennem kolonnen. Der kræves ikke kvantitative analysemetoder, og det er kun nødvendigt at bestemme retentionstiderne.

8. Et teststofs octanol/vand-fordelingskoefficient kan beregnes ved eksperimentelt at bestemme dets kapacitetsfaktor k og indsætte k i følgende ligning:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

hvor

a, b = lineære regressionskoefficienter.

Ligningen ovenfor kan opnås ved lineær regression af logaritmen for referencestoffernes octanol/vand-fordelingskoefficienter mod logaritmen for referencestoffernes kapacitetsfaktorer.

9. Med omvendt fase-HPLC-metoden kan der skønnes fordelingskoefficienter i log P_{ow}-området fra 0 til 6, men metoden kan udvides til undtagelsesvis at omfatte log P_{ow}-området fra 6 til 10. Det kan gøre det nødvendigt at ændre den mobile fase (3). Metoden kan ikke benyttes til stærke syrer og baser, metalkomplekser, overfladeaktive stoffer og stoffer, der reagerer med elueringsmidlet. Målinger på ioniserbare stoffer kan udføres på den ikke-ioniserede form (fri syre eller fri base) og kun ved anvendelse af en passende buffer med en pH-værdi på under pK_a for en fri syre eller over pK_a for en fri base. Hvis den pH-metriske metode til testning af ioniserbare stoffer (pH-Metric Method for Ionisable Substances (6)) bliver tilgængelig, vil den kunne benyttes som en alternativ metode. Hvis log P_{ow}-værdien bestemmes med henblik på miljøfareklassificering eller miljørisikovurdering, bør testen udføres inden for det pH-område, der er relevant for det naturlige miljø, dvs. i pH-området 5,0-9.

10. I visse tilfælde kan urenheder vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne på grund af usikker tilforordning af toppene. For blandinger, der giver et uopløst bånd, anføres en øvre og nedre grænse for log P_{ow} og område- % af hver log P_{ow}-top. For blandinger, som er en gruppe af homologer, anføres også det vægtede gennemsnit af log P_{ow} (7), som beregnes på grundlag af de enkelte P_{ow}-værdier og de tilsvarende område- %-værdier (8). Alle toppe, der bidrager med et område på mindst 5 % til det samlede topareal, bør tages i betragtning i beregningen (9):

▼**M6**

$$vægtet\ gns.\ af\ \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(aeral\ \%)}{samlet\ topareal\ \%} = \frac{\sum (log\ P_{owi})(areal\ \%_i)}{\sum_i areal\ \%}$$

Det vægtede gennemsnit af log P_{ow} gælder kun for stoffer eller blandinger (f.eks. tallolie), der består af homologer (f.eks. serier af alkaner). Blandinger kan måles med relevante resultater, forudsat at den anvendte analytiske detektor har samme følsomhed over for alle stoffer i blandingen og kan opløses i tilstrækkelig grad.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

11. Stoffets dissociationskonstant, strukturformel og opløselighed i den mobile fase skal være kendt forud for anvendelsen af metoden. Derudover er det nyttigt at have oplysninger om hydrolyseegenskaber.

KVALITETSKRITERIER

12. For at øge tilliden til målingen foretages der dobbeltbestemmelse.

— Repeterbarhed: Værdien for log P_{ow} beregnet ud fra gentagne målinger foretaget under identiske betingelser og med samme sæt referencestoffer skal ligge inden for et interval på ± 0,1 logenheder.

— Reproducerbarhed: Hvis målingerne gentages med et andet sæt referencestoffer, kan der forekomme andre resultater. Typisk ligger korrelationskoefficienten R for sammenhængen mellem log k og log P_{ow} for et sæt teststoffer på omkring 0,9, hvilket svarer til en octanol/vand-fordelingskoefficient på log P_{ow} + 0,5 logenheder.

13. Den sammenlignende laboratorieundersøgelse har vist, at der med HPLC-metoden kan opnås log P_{ow}-værdier på ± 0,5 enheder i forhold til de værdier, der er opnået med rystekolbemetoden (2). Andre sammenligninger kan findes i litteraturen (4)(5)(10)(11)(12). Korrelationskurver baseret på strukturmæssigt beslægtede stoffer giver de mest nøjagtige resultater (13).

REFERENCESTOFFER

14. For at kunne korrelere den målte kapacitetsfaktor k for et stof med dets P_{ow} skal der fastlægges en kalibreringskurve, som er baseret på mindst seks punkter (se punkt 24). Det er op til brugeren at vælge passende referencestoffer. Referencestoffet bør normalt have log P_{ow}-værdier, der omfatter teststoffets log P_{ow}, hvilket vil sige, at mindst et referencestof skal have en P_{ow}-værdi på over teststoffets værdi og en anden P_{ow}-værdi på under teststoffets værdi. Ekstrapolation bør kun anvendes i særlige tilfælde. Det foretrækkes, at referencestofferne er strukturmæssigt beslægtet med teststoffet. log P_{ow}-værdierne for de referencestoffer, der bruges til kalibreringen, skal være baseret på pålidelige forsøgsdata. For stoffer med høj log P_{ow} (normalt over 4) kan der anvendes beregnede værdier, medmindre der foreligger pålidelige forsøgsdata. Hvis der bruges ekstrapolerede værdier, skal der anføres en grænseværdi.

15. Der foreligger omfattende lister med log P_{ow}-værdier for mange grupper af kemikalier (14)(15). Hvis der ikke foreligger data om fordelingskoefficienter for strukturmæssigt beslægtede stoffer, kan der bruges en mere generel kalibrering foretaget med andre referencestoffer. Anbefalede referencestoffer og deres P_{ow}-værdier er anført i tabel 1. For ioniserbare stoffer gælder de anførte værdier den ikke-ioniserede form. Værdierne blev kontrolleret med hensyn til sandsynlighed og kvalitet under den sammenlignende laboratorieundersøgelse.

▼**M6**

Tabel 1

Anbefalede referencestoffer

	CAS-nummer	Referencestof	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanon (methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylpyridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Phenoxyeddikesyre	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Phenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Phenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-methylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetophenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzoesyre	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Cinnamylalkohol (kanelalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoesyre	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-cresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kanelsyre	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Methylbenzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	3-methylbenzoesyre	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichlorethylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Ethylbenzoat	2,6	

▼**M6**

	CAS-nummer	Referencestof	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-dichlorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-chlorbenzoesyre	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloranilin	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzen	2,8	
36	1746-13-0	Allylphenylether	2,9	
37	108-86-1	Brombenzen	3,0	
38	100-41-4	Ethylbenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzophenon	3,2	
40	92-69-3	4-phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorbenzen	3,4	
43	122-39-4	Diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalen	3,6	
45	93-99-2	Phenylbenzoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzylbenzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorbenzen	4,2	
52	143-07-7	Dodecansyre	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Diphenylether	4,2	
54	85-01-8	Phenanthren	4,5	
55	104-51-8	n-butylbenzen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-diphenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthen	5,1	
59	603-34-9	Triphenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

BESKRIVELSE AF METODEN

Foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten

16. Om nødvendigt kan teststoffets fordelingskoefficient skønnes enten ved beregning (se tillæg) eller i givet fald ud fra teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler.

Apparatur

17. Der kræves en væskekromatograf med pumpe med lav pulsation og passende detektionssystem. En UV-detektor, der bruger en bølgelængde på 210 nm, eller en RI-detektor kan anvendes på en lang række kemiske grupper. Polære grupper i den stationære fase kan nedsætte HPLC-kolonnens ydeevne væsentligt. Derfor skal stationære faser have det lavest mulige procentindhold af polære grupper (16). Der kan anvendes kommercielt mikroniseret pakkemateriale med omvendt fase eller færdigpakkede kolonner. Der kan eventuelt anbringes en beskyttelseskolonne mellem injektionssystemet og analysekolonnen.

Mobil fase

18. Der anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret eller deioniseret vand til fremstilling af elueringsvæsken, som afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Den anvendte methanol/vand-blanding skal indeholde mindst 25 % vand. Til eluering af stoffer med en log P på 6 på en time ved en flowhastighed på 1 ml/min. vil en blanding af methanol og vand i forholdet 3:1 (v/v) typisk være tilfredsstillende. For stoffer med en log P-værdi på over 6 kan det være nødvendigt at nedsætte elueringstiden (også for referencestofferne) ved at benytte en mindre polær mobil fase eller en kortere kolonne.

19. Både teststof og referencestoffer skal være opløselige i den mobile fase i en så høj koncentration, at de kan påvises. Der må kun undtagelsesvis benyttes tilsætningsstoffer til methanol/vand-blandingen, da tilsætningsstoffer vil ændre kolonnens egenskaber. I disse tilfælde skal det kontrolleres, at retentionstiden for teststof og referencestoffer er upåvirket. Hvis en methanol/vand-blanding ikke er egnet, kan der anvendes andre blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, f.eks. ethanol/vand, acetonitril/vand eller isopropylalkohol-(2-propanol)/vand.

20. For ioniserbare stoffer er elueringsvæskens pH kritisk. Det skal ligge inden for kolonnens pH-driftsområde, normalt fra 2 til 8. Det anbefales at anvende buffer. Man må være omhyggelig med at undgå saltudfældning og ødelæggelse af kolonnen, hvilket kan forekomme med visse blandinger af organisk fase og buffer. Det frarådes normalt at foretage HPLC-målinger med silicabaserede stationære faser med en pH over 8, da brug af en alkalisk mobil fase kan føre til, at kolonnens ydeevne hurtigt falder.

Opløste stoffer

21. Teststof og referencestoffer skal være tilstrækkeligt rene til, at toppene i kromatogrammerne kan henføres til de respektive stoffer. Til test- og kalibreringsformål opløses stofferne om muligt i den mobile fase. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end den mobile fase til at opløse test- og referencestofferne, skal den mobile fase benyttes til slutfortyndingen forud for indsprøjtningen.

Testbetingelser

22. Under målingen må temperaturen ikke variere med mere end ± 1 °C.

▼M6

Bestemmelse af dødtid t_0

23. Dødtiden t_0 kan måles med organiske stoffer, der ikke holdes tilbage (f.eks. thiourinstof eller formamid). En mere præcis dødtid kan beregnes på grundlag af de målte retentionstider eller et sæt af ca. syv medlemmer af en homolog række (f.eks. n-alkylmethylketoner) (17). Retentionstiderne t_R (n_C + 1) afbildes mod t_R (n_C), hvor n_C er antallet af kulstofatomer. Der frembringes en ret linje, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, hvor A, der repræsenterer k(n_C + 1)/k(n_C), er konstant. Dødtiden t_0 bestemmes af skæringspunktet (1 – A)t_0 og hældningskoefficienten A.

Regressionsligning

24. Næste trin består i at konstruere en korrelationskurve af log k mod log P for passende referencestoffer med log P-værdier i nærheden af den værdi, der forventes for teststoffet. I praksis indsprøjtes der 6-10 referencestoffer samtidigt. Retentionstiderne bestemmes, helst med en integrationsskriver, der er koblet til detektionssystemet. De tilsvarende logaritmer for kapacitetsfaktorerne, log k, afsættes som funktion af log P. Regressionsligningen foretages regelmæssigt, mindst en gang dagligt, så der kan tages højde for eventuelle ændringer i kolonnens ydeevne.

BESTEMMELSE AF TESTSTOFFETS P_{OW}

25. Teststoffet indsprøjtes i den lavest påviselige mængde. Retentionstiden bestemmes dobbelt. Teststoffets fordelingskoefficient fås ved interpolation af den beregnede kapacitetsfaktor på kalibreringskurven. Ved meget lave og meget høje fordelingskoefficienter er det nødvendigt at ekstrapolere. Især i sådanne tilfælde må man være særlig opmærksom på regressionslinjens konfidensgrænser. Hvis prøvens retentionstid ligger uden for det interval af retentionstider, der er opnået for standarderne, skal der anføres en grænseværdi.

DATA OG RAPPORTERING

Testrapport

26. Følgende skal anføres i rapporten:

— hvis de er bestemt i det foreløbige skøn over fordelingskoefficienten, de tilnærmede værdier og den anvendte metode; og hvis en beregningsmetode blev anvendt, en fuld beskrivelse heraf, herunder identifikation af de anvendte datas oprindelse og detaljerede oplysninger om valg af fragmenter

— test- og referencestoffer: renhedsgrad, strukturformel og CAS-nummer

— beskrivelse af udstyr og driftsbetingelser: analyse- og beskyttelseskolonne

— mobil fase, detektionssytem, temperaturinterval, pH

— elueringsprofiler (kromatogrammer)

— dødtiden og hvordan den er målt

— retentionsdata og litteraturværdier for log P_{ow} for referencestoffer benyttet ved kalibrering

— detaljerede oplysninger om den fittede regressionslinje (log k mod log P_{ow}) og linjens korrelationskoefficient, herunder konfidensintervaller

▼**M6**

— gennemsnitlige retentionsdata og interpoleret log P_{ow}-værdi for teststoffet

— for blandinger: elueringsprofilkromatogram med anførte tærskelværdier

— log P_{ow}-værdier i forhold til område- % af log P_{ow}-toppen

— beregning med en regressionslinje

— beregnede log P_{ow}-værdier som vægtet gennemsnit, når det er relevant.

LITTERATUR

(1) C. V. Eadsforth og P. Moser (1983), Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients, Chemosphere, 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss og H. J. Poremski (1988), Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method, Chemosphere, 17, 361.

(3) C. V. Eadsforth (1986), Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient, Pesticide Science, 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt og R. Fuerer (1981), Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients, Pesticide Science, 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981), Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography, Chemosphere, 10, 73.

(6) OECD (2000), Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances, Draft Guideline, november 2000.

(7) OSPAR (1995), »Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995«, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20.-24. februar 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez og C. C. Karman (1999), An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999, Version 1.0, 3, august.

(9) E. A. Vik, S. Bakke og K. Bansal (1998), Partitioning of Chemicals, Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges, Environmental Modelling & Software Vol. 13, s. 529-537.

(10) L. O. Renberg, S. G. Sundstroem og K. Sundh-Nygård (1980), Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes, Chemosphere, 9, 683.

(11) W. E. Hammers, G. J. Meurs og C. L. De-Ligny (1982), Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system, J. Chromatography 247, 1.

(12) J. E. Haky og A. M. Young (1984), Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds, J. Liq. Chromatography, 7, 675.

(13) S. Fujisawa og E. Masuhara (1981), Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography, Journal of Biomedical Materials Research, 15, 787.

▼**M6**

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

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

(16) R. F. Rekker og H. M. de Kort (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther, 14, 479.

(17) G. E. Berendsen, P. J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony og J. Inczédy (1980), On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography, J. Liq. Chromato, 3, 1669.

▼M6

Tillæg

P_{OW}-beregningsmetoder

INDLEDNING

1. Dette tillæg indeholder en kort introduktion til beregningen af P_{ow}. Yderligere oplysninger kan findes i lærebøger (1)(2).

2. Beregnede værdier for P_{ow} bruges til at:

— beslutte, hvilken forsøgsmetode der skal bruges: rystekolbemetoden for log P_{ow} på mellem – 2 og 4 og HPLC-metoden for log P_{ow} på mellem 0 og 6

— vælge betingelserne for HPLC (referencestoffer, methanol/vand-forhold)

— kontrollere sandsynligheden af de værdier, der er opnået med forsøgsmetoderne

— give et skøn, i tilfælde hvor der ikke kan anvendes forsøgsmetoder.

Princippet bag beregningsmetoderne

3. Alle de beskrevne beregningsmetoder er baseret på teoretisk fragmentering af molekylet i passende delstrukturer, for hvilke man har pålideligt kendskab til log P_{ow}-inkrementer. Log P_{ow} fås ved at summere fragmentværdierne og korrektionsudtrykkene for intramolekylære vekselvirkninger. Der foreligger lister over fragmentkonstanter og korrektionsudtryk (1)(2)(3)(4)(5)(6). Nogle af dem ajourføres regelmæssigt (3).

De beregnede værdiers pålidelighed

4. Sædvanligvis aftager beregningsmetodens pålidelighed med, at det undersøgte stofs kompleksitet stiger. For simple molekyler med lav molekylvægt og en eller to funktionelle grupper kan der forventes en afvigelse på 0,1 til 0,3 mellem resultatet af forskellige fragmenteringsmetoder og den målte værdi for log P_{ow}. Fejlmargenen afhænger af, hvor pålidelige de anvendte fragmentkonstanter er, om intramolekylære vekselvirkninger (f.eks. hydrogenbindinger) kan genkendes, og om korrektionsudtrykkene anvendes korrekt. Ved ioniserende stoffer skal ladningen og ioniseringsgraden tages i betragtning (10).

Fujita-Hansch π-metoden

5. Konstanten for hydrofobe substituenter, π, som indførtes af Fujita et al. (7), defineres som:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

hvor PhX er et aromatisk derivat, og PhH er moderstoffet.

$$\text{f.eks.}\quad ^{\pi}Cl = \log Pow\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

π-metoden er primært relevant for aromatiske stoffer. Der foreligger π-værdier for en lang række substituenter (4)(5).

Rekkers metode

6. Efter Rekker (8) beregnes værdien af log P_{ow} således:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vekselvirkningsudtryk})$$

▼M6

hvor a_i er den hyppighed, hvormed et givet fragment forekommer i molekylet, og f_i er fragmentets log P_{ow}-inkrement. Vekselvirkningsudtrykkene kan udtrykkes som et heltalsmultiplum af en enkelt konstant C_m (den såkaldte »magiske konstant«). Fragmentkonstanterne f_i og C_m er bestemt på grundlag af en liste med 1 054 eksperimentelt bestemte P_{ow}-værdier for 825 stoffer ved hjælp af flerdimensional regressionsanalyse (6)(8). Vekselvirkningsudtrykkene bestemmes efter faste regler (6)(8)(9).

Hansch-Leos metode

7. Efter Hansch og Leo (4) beregnes værdien af log P_{ow} således:

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

hvor f_i er en fragmentkonstant, F_j er et korrektionsudtryk (faktor), og a_i og b_j er de dertil hørende hyppigheder. Ud fra eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} har man ved at prøve sig frem kunnet opstille lister over atom- og gruppefragmentværdier og over korrektionsudtryk F_j. Korrektionsudtrykkene er inddelt i flere forskellige klasser (1)(4). Der er udviklet edb-programmer for at tage højde for alle regler og korrektionsudtryk (3).

KOMBINERET METODE

8. Beregningen af log P_{ow} for komplekse molekyler kan forbedres betydeligt, hvis molekylet deles op i større delstrukturer, som man har pålidelige log P_{ow}-værdier for, enten fra tabeller (3)(4) eller fra eksisterende målinger. Sådanne fragmenter (f.eks. heterocykliske forbindelser, anthraquinon, azobenzen) kan dernæst kombineres med Hansch-π-værdier eller Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Bemærkninger

i) Beregningsmetoderne kan kun anvendes på helt eller delvist ioniserede stoffer, hvis de nødvendige korrektionsfaktorer tages i betragtning.

ii) Hvis der må antages at forekomme intramolekylære hydrogenbindinger, må det hertil svarende korrektionsudtryk (ca. + 0,6 til + 1,0 log P_{ow}-enheder) lægges til (1). Modeller og spektroskopiske data kan afsløre, om der kan være tale om sådanne bindinger.

iii) Hvis flere tautomere former er mulige, benyttes den mest sandsynlige form som grundlag for beregningen.

iv) Man skal nøje følge med i revisioner af lister over fragmentkonstanter.

LITTERATUR OM BEREGNINGSMETODER

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Reehl og D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W. J. Dunn, J. H. Block og R. S. Pearlman (ed.), Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986),

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

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

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch og D. Elkins (1971), Partition coefficients and their uses, *Chemical. Reviews*, 71, 525.

(6) R. F. Rekker og H. M. de Kort (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther,* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa og Corwin Hansch (1964), A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients, *J. Amer. Chem. Soc*, 86, 5175.

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

(9) C. V. Eadsforth og P. Moser (1983), Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients, *Chemosphere,* 12, 1459.

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

▼M7

A.25 DISSOCIATIONSKONSTANTER I VAND (TITRERINGSMETODE — SPEKTROFOTOMETRISK METODE — KONDUKTOMETRISK METODE)

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 112 (1981).

Forudsætninger

— Passende analysemetode

— Vandopløselighed

Vejledning

— Strukturformel

— Elektrisk ledningsevne for konduktometrisk metode

Generelt om forsøgsmetoden

— Alle forsøgsmetoder kan udføres på rene stoffer eller stoffer af handelskvalitet. De mulige virkninger af urenheder for resultaterne bør tages i betragtning.

— Titreringsmetoden er ikke egnet til tungtopløselige stoffer (jf. Testopløsninger nedenfor).

— Den spektrofotometriske metode gælder kun for stoffer med meget forskellige UV/VIS-absorptionsspektre for dissocierede og udissocierede former. Denne metode kan også være egnet til tungtopløselige stoffer og ikke-syre/base-dissociation, f.eks. kompleksdannelse.

— I tilfælde, hvor Onsager-ligningen holder, kan den konduktometriske metode anvendes, selv ved moderat lave koncentrationer og selv i tilfælde af ikke-syre/base-ligevægt.

Standarddokumenter

Denne forsøgsmetode er baseret på metoder, der er anført i henvisningerne i afsnittet »Litteratur«, og i retningslinjerne af 18. august 1978, Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA.

METODE — INDLEDNING, FORMÅL, ANVENDELSESOMRÅDE, RELEVANS, ANVENDELSE OG AFGRÆNSNING AF TESTEN

Dissociation af et stof i vand har betydning for at kunne vurdere dets indvirkning på miljøet. Det bestemmer stoffets form, som igen bestemmer dets adfærd og transport. Det kan påvirke kemikaliets adsorption på jord og sedimenter og absorption i biologiske celler.

Definitioner og enheder

Dissociation er reversibel opdeling i to eller flere kemiske bestanddele, som kan være ioniske. Processen kendes generelt ved

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

og koncentrationens ligevægtskonstant for reaktionen er

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

F.eks. i det særlige tilfælde, hvor R er hydrogen (stoffet er en syre), er konstanten

▼M7

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

eller

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

Referencestoffer

Følgende referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Formålet med dem er primært at sikre, at metoden til enhver tid kan kalibreres og give mulighed for at sammenligne resultaterne med andre anvendte metoder.

	pK_a ([1])	Temp. i °C
p-Nitrophenol	7,15	25 ([1])
Benzoesyre	4,12	20
p-Chloranilin	3,93	20

([1]) Der findes ingen værdi for 20 °C, men det må formodes, at variabiliteten af måleresultaterne er højere end den forventede temperaturafhængighed.

Det ville være nyttigt med et stof med flere pK'er som anført under Forsøgsmetodens princip nedenfor. Et sådant stof kunne være:

Citronsyre	pK_a (8)	Temp. i °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Forsøgsmetodens princip

Den beskrevne kemiske proces er generelt kun lidt temperaturafhængig i det miljømæssigt relevante temperaturområde. Bestemmelse af dissociationskonstanten kræver en måling af koncentrationerne af de dissocierede og udissocierede former af det kemiske stof. Ud fra viden om støkiometrien for dissociationsreaktionen, som er angivet under Definitioner og enheder ovenfor, kan den rigtige konstant beregnes. I det tilfælde, der er beskrevet lige netop i denne forsøgsmetode, opfører stoffet sig som en syre eller base, og bestemmelsen foretages nemmest ved at bestemme de relative koncentrationer af de ioniserede og ikke-ioniserede former af stoffet og opløsningens pH-værdi. Forholdet mellem disse betingelser er givet ved ligningen for pK_a i Definitioner og enheder, se ovenfor. Nogle stoffer udviser mere end en dissociationskonstant, og tilsvarende ligninger kan udvikles. Nogle af de heri beskrevne metoder er også velegnede til ikke-syre/base-dissociation.

Kvalitetskriterier

Repeterbarhed

Dissociationskonstanten bør replikeres (mindst tre bestemmelser) med en nøjagtighed på ± 0,1 logenheder.

BESKRIVELSE AF TESTPROCEDURERNE

Der findes to grundlæggende metoder til bestemmelse af pK_a. Den ene omfatter titrering af en kendt mængde af stoffet med standardsyre eller -base, alt efter hvad der er relevant. Den anden går ud på at finde frem til den relative koncentration af de ioniserede og ikke-ioniserede former og pH-afhængigheden.

▼M7

Forberedelser

Metoder baseret på disse principper kan klassificeres som titrering, spektrofotometriske og konduktometriske procedurer.

Testopløsninger

Til titreringsmetoden og den konduktometriske metode bør det kemiske stof opløses i destilleret vand. Ved den spektrofotometriske metode og andre metoder anvendes bufferopløsninger. Koncentrationen af teststoffet bør ikke overstige den laveste værdi af 0,01 M eller halvdelen af mætningskoncentrationen, og ved fremstilling af opløsningerne bør der anvendes den reneste tilgængelige form af stoffet. Hvis stoffet kun er svagt opløseligt, kan det opløses i en lille mængde af et opløsningsmiddel, som er blandbart med vand, inden det tilsættes de ovenfor anførte koncentrationer.

Opløsninger bør kontrolleres for emulsioner ved hjælp af en Tyndall-stråle, især hvis der er anvendt et hjælpeopløsningsmiddel til at forbedre opløseligheden. Såfremt der anvendes bufferopløsninger, bør bufferkoncentrationen ikke overstige 0,05 M.

Testbetingelser

Temperatur

Temperaturen bør reguleres til mindst ± 1 °C. Bestemmelsen bør fortrinsvis udføres ved 20 °C.

Hvis der er mistanke om en betydelig temperaturafhængighed, bør bestemmelsen foretages ved mindst to andre temperaturer. Temperaturintervallerne bør i dette tilfælde være 10 °C og temperaturreguleringen ± 0,1 °C.

Analyser

Metoden vil afhænge af arten af det stof, der testes. Den skal være tilstrækkeligt følsom til, at de forskellige arter for hver koncentration af testopløsningen kan bestemmes.

Testens udførelse

Titreringsmetode

Testopløsningen bestemmes ved titrering med enten standardbase- eller standardsyreopløsningen, idet pH-værdien måles efter hver tilsætning af referenceopløsningen. Der bør foretages mindst 10 tilsætninger inden ækvivalenspunktet. Hvis der opnås ligevægt tilstrækkeligt hurtigt, kan der anvendes et registreringspotentiometer. Til denne metode skal både den samlede mængde af stoffet og dets koncentration kendes nøjagtigt. Der skal tages forholdsregler for at udelukke kuldioxid. Oplysninger om procedure, forholdsregler og beregning findes i standardtest, f.eks. henvisning (1), (2), (3) og (4).

Spektrofotometrisk metode

Bølgelængden er der, hvor de ioniserede og ikke-ioniserede former af stoffet har mærkbart forskellige ekstinktionskoefficienter. UV/VIS-absorptionsspektrummet er fremstillet af opløsninger af konstant koncentration i en pH-tilstand, hvor stoffet er i det væsentlige ioniseret og fuldt ud ioniseret med flere mellemliggende pH-værdier. Dette kan gøres ved enten at tilsætte flere portioner koncentreret syre (base) til en relativt stor mængde opløsning af stoffet i en flerkomponentbuffer, i første omgang ved høj (lav) pH (henvisning 5), eller ved at tilføje lige store mængder af en stamopløsning af stoffet i f.eks. vand, methanol, til konstante mængder af forskellige bufferopløsninger, der dækker det ønskede pH-interval. Ud fra pH- og absorbansværdier på den valgte bølgelængde beregnes et tilstrækkeligt antal værdier for pK_a ved hjælp af data fra mindst fem pH-værdier, når stoffet er mindst 10 % og højst 90 % ioniseret. Yderligere forsøgsoplysninger og beregningsmetode findes i henvisning (1).

▼M7

Konduktometrisk metode

Ved hjælp af en celle med en lille, kendt cellekonstant måles ledningsevnen for en opløsning af stoffet på ca. 0,1 M i vand til måling af ledningsevne. Ledningsevnen i en række nøjagtige fortyndinger af denne opløsning måles ligeledes. Koncentrationen halveres hver gang, og serien bør som minimum omfatte en størrelsesorden. Den begrænsende ledningsevne ved uendelig fortynding findes ved at gennemføre et lignende forsøg med Na-salt og ekstrapolere. Graden af dissociation kan derefter beregnes ud fra ledningsevnen for hver opløsning ved hjælp af Onsager-ligningen, og dermed kan dissociationskonstanten ved hjælp af Ostwalds fortyndingslov beregnes som $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, hvor C er koncentrationen i mol pr. liter, og α er den dissocierede fraktion. Der skal tages forholdsregler for at udelukke kuldioxid. Yderligere forsøgsoplysninger og beregningsmetode findes i standardtekster og henvisning (1), (6) og (7).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Titreringsmetode

PK_a beregnes for 10 målte punkter på titreringskurven. Gennemsnit af og standardafvigelse for sådanne pKa-værdier beregnes. Der bør indgå et plot af pH-værdien over for mængden af standardbase eller -syre sammen med en tabelpræsentation.

Spektrofotometriske metoder

Absorbans og pH-værdi er opstillet for hvert spektrum. Mindst fem værdier for pK_a beregnes ud fra de mellemliggende spektrale datapunkter, og gennemsnit af og standardafvigelse for resultaterne beregnes også.

Konduktometrisk metode

Den ækvivalente ledningsevne Λ beregnes for hver syrekoncentration og for hver koncentration af en blanding af en ækvivalent af syre plus 0,98 ækvivalent af carbonatfri natriumhydroxid. Der er et overskud af syre for at forhindre overskydende OH^- på grund af hydrolyse. $1/\Lambda$ plottes i forhold til $\sqrt{C}$, og Λ_o af saltet kan findes ved ekstrapolering til nulkoncentration.

Λ_o af syren kan beregnes ved at anvende litteraturværdier for H^+ og Na^+. PK_a kan beregnes ud fra $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ og $K_a = \alpha^2C/(1 — \alpha)$ for hver koncentration. Der kan opnås bedre værdier for K_a ved at korrigere for mobilitet og aktivitet. Gennemsnit af og standardafvigelse for pK_a- værdierne bør beregnes.

Testrapport

Alle rådata og beregnede pK_a-værdier bør indgives sammen med beregningsmetoden (helst i tabelformat som foreslået i henvisning 1) ligesom de ovenfor beskrevne statistiske parametre. For titreringsmetoder bør der gives oplysninger om standardisering af referenceopløsninger.

For den spektrofotometriske metode bør alle spektre fremlægges. For den konduktometriske metode bør der gives oplysninger om bestemmelsen af cellekonstant. Der bør gives oplysninger om anvendt teknik, analysemetoder og arten af eventuelle anvendte buffere.

Testtemperaturen eller testtemperaturerne bør rapporteres.

LITTERATUR

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

▼**M7**

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

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

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

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

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

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (jf. (4) ovenfor).

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

▼B

DEL B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET OG ANDRE SUNDHEDSVIRKNINGER

Indholdsfortegnelse

GENEREL INDLEDNING

B.1.A. AKUT ORAL TOKSICITET — FASTDOSISMETODEN

B.1.B. AKUT ORAL TOKSICITET — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN

B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

B.3. AKUT TOKSICITET (DERMAL)

B.4. AKUT HUDIRRITATION/-ÆTSNING

B.5. AKUT ØJENIRRITATION/-ÆTSNING

B.6. HUDSENSIBILISERING

B.7. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL) HOS GNAVERE

B.8. SUBAKUT TOKSICITET (INHALATION): 28-DAGES FORSØG

B.9. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)

B.10. *IN VITRO*-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR

B.11. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

B.12. TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

B.13/14. MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER

B.17. *IN VITRO*-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF HPRT- OG XPRT-GENER

B.21. CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

B.22. TEST TIL PÅVISNING AF DOMINERENDE DØDELIG MUTATION – GNAVERE

▼B

B.23.	TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR
B.25.	ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS
B.26.	SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE
B.27.	SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ IKKE-GNAVERE
B.28.	SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN — 90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE
B.29.	SUBKRONISK TOKSICITET (INHALATION): 90-DAGES FORSØG
B.30.	FORSØG VEDRØRENDE KRONISK TOKSICITET
B.31.	PRÆNATAL UDVIKLINGSTOKSICITETSUNDERSØGELSE
B.32.	KARCINOGENICITETSFORSØG
B.33.	KOMBINERET FORSØG VEDRØRENDE KARCINOGENICITET/KRONISK TOKSICITET
B.34.	REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION
B.35.	REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER
B.36.	TOKSIKOKINETIK
B.37.	FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER EFTER AKUT EKSPONERING
B.38.	FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER GENTAGEN DOSIS — 28 DAGE
B.39.	TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTESE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO
B.40.	IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE TIL MÅLING AF TRANSKUTAN ELEKTRISK MODSTAND (TER)
B.40.A.	IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS (RhE)
B.41.	IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST
B.42.	HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER

▼B

B.43. NEUROTOKSICITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE

B.44. HUDABSORPTION: IN VIVO-METODE

B.45. HUDABSORPTION: IN VITRO-METODE

B.46. IN VITRO-HUDIRRITATION: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS

B.47. FORSØGSMETODE TIL PÅVISNING AF OKSECORNEA-UKLARHED OG -PERMEABILITET TIL IDENTIFIKATION AF I) KEMIKALIER, DER MEDFØRER ALVORLIG ØJENSKADE, OG II) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIG ØJENSKADE

B.48. ISOLERET KYLLINGEØJE-FORSØGSMETODE TIL IDENTIFIKATION AF I) KEMIKALIER, DER FREMKALDER ALVORLIG ØJENSKADE OG II) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIG ØJENSKADE

B.49. *IN VITRO*-MIKROKERNETEST I PATTEDYRCELLER

B.50. HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: DA

B.51. HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: BrdU-ELISA

B.52. AKUT TOKSICITET (INHALATION) — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN

B.53. UNDERSØGELSE AF NEUROTOKSICITET UNDER UDVIKLINGEN

B.54. UTERUSTESTEN I GNAVERE: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR ØSTROGENECITET

B.55. HERSHBERGER-TESTEN I ROTTER: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR (ANTI)ANDROGENE EGENSKABER

B.56. UDVIDET REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I ÉN GENERATION

B.57. H295R STEROIDSYNTESETESTEN

B.58. GENMUTATIONSTEST I SOMATISKE CELLER OG KØNSCELLER FRA TRANSGENE GNAVERE

B.59. IN CHEMICO-HUDSENSIBILISERING: DIREKTE PEPTIDREAKTIVITETSASSAY (DPRA)

B.60. IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: ARE-NRF2-LUCIFERASE-FORSØGSMETODEN

B.61. FLUORESCEINUDSIVNINGS-FORSØGSMETODEN TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER

B.62. ALKALISK *IN VIVO*-KOMETASSAY MED PATTEDYR

▼B

B.63. SCREENINGSTEST FOR REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGS-TOKSICITET

B.64. KOMBINERET SCREENINGSTEST FOR TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING OG REPRODUKTIONS-/UDVIK-LINGSTOKSICITET

B.65. *IN VITRO*-MEMBRANBARRIEREFORSØGSMETODE FOR HUDÆTSNING

B.66. STABILT TRANSFEKTEREDE *IN VITRO*-TRANSAKTIVE-RINGSASSAYS TIL PÅVISNING AF ØSTROGENRECEPTO-RAGONISTER OG -ANTAGONISTER

B.67. IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF THYMIDIN-KINASEGENET

B.68. FORSØGSMETODE MED KORTVARIG EKSPONERING IN VITRO TIL IDENTIFIKATION AF i) KEMIKALIER, DER FREMKALDER ALVORLIGE ØJENSKADER, OG ii) KEMIKA-LIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIR-RITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER

B.69. FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMANT CORNEA-LIGNENDE EPITHEL (RhCE) TIL PÅVISNING AF KEMIKALIER, SOM IKKE KRÆVER KLASSIFICERING OG MÆRKNING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER

B.70. *IN VITRO*-ASSAYS MED HUMAN REKOMBINANT ØSTROGENRECEPTOR (hrER) TIL PÅVISNING AF KEMIKA-LIER MED ER-AFFINITET

B.71. *IN VITRO* HUDSENSIBILISERINGSASSAYS AF DEN CENTRALE BEGIVENHED AKTIVERING AF DENDRITISKE CELLER I ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FOR HUDSENSIBILISERING

▼B

GENEREL INDLEDNING

A. **BESKRIVELSE AF TESTSTOFFET**

Teststoffets sammensætning, herunder de vigtigste urenheder, og dets relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder dets stabilitet, skal være kendt forud for enhver undersøgelse af toksicitet.

Teststoffets fysisk-kemiske egenskaber giver en række vigtige oplysninger for valget af administrationsmåde, udformningen af hver enkelt undersøgelse samt håndtering og opbevaring af teststoffet.

Forud for undersøgelsen bør der udvikles en analysemetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af stoffet (herunder vigtige urenheder, såfremt dette er muligt) i doseringsmediet og i det biologiske materiale.

Alle oplysninger om teststoffets identitet, fysisk-kemiske egenskaber, renhed og adfærd medtages i testrapporten.

B. **PASNING AF DYR**

Ved toksicitetstest er det afgørende, at der føres nøje kontrol med testmiljøet, og at dyrene passes korrekt.

i) *Miljø*

Miljøet i forsøgsstalde og -bure skal afpasses efter dyrearten. For rotter, mus og marsvin er en rumtemperatur på 22 ± 3 °C og en relativ luftfugtighed på 30-70 % passende; for kaniner bør temperaturen være på 20 ± 3 °C og den relative luftfugtighed på 30-70 %.

Nogle forsøgsteknikker er særlig følsomme over for temperaturafvigelser, og i sådanne tilfælde indeholder beskrivelsen af testmetoden nærmere oplysninger om passende forsøgsbetingelser. Ved alle undersøgelser af toksiske virkninger skal temperaturen og luftfugtigheden kontrolleres, registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Der bør anvendes kunstig belysning, som følger en rytme med 12 timers lys og 12 timers mørke. Oplysninger om belysningsrytmen registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Medmindre andet er angivet i metoden, kan dyrene opbevares i bure hver for sig eller i små grupper af samme køn, dog højst fem dyr pr. bur.

I rapporter over dyreforsøg er det vigtigt at anføre, hvilken type bure der er anvendt, og hvor mange dyr der har været i hvert bur, såvel under eksponering for det kemiske stof som i en efterfølgende observationsperiode.

▼B

ii) *Fodring*

Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller. Hvis teststofferne indgives med foder, kan reaktioner mellem teststoffet og foderbestanddele medføre, at næringsværdien nedsættes. Muligheden af en sådan reaktion skal tages i betragtning, når forsøgsresultaterne fortolkes. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Valget af foder kan afhænge af, at teststoffet skal kunne iblandes foderet på passende måde, hvis teststoffet indgives med foderet.

Forureninger i foderet, som vides at influere på toksiciteten, må ikke forefindes i interfererende koncentrationer.

C. **ALTERNATIV TESTNING**

Den Europæiske Union har sat sig som mål at udvikle og validere alternative metoder, som kan give oplysninger på samme niveau som de nuværende dyreforsøg, men som anvender færre dyr, forårsager mindre smerte, eller hvor brugen af dyr fuldstændig kan undgås.

Efterhånden som sådanne metoder udvikles, skal de så vidt muligt tages i anvendelse i forbindelse med risikobeskrivelse og efterfølgende klassifikation og etikettering baseret på den potentielle fare ved de pågældende stoffer.

D. **VURDERING OG FORTOLKNING**

Ved vurdering og fortolkning af resultaterne af dyreforsøg og in vitro-undersøgelser skal der tages hensyn til, at der er grænser for, i hvilket omfang de kan ekstrapoleres direkte til mennesker, dokumentation for skadelige virkninger på mennesker, hvor sådan foreligger, skal derfor anvendes til at bekræfte testresultaterne.

E. **HENVISNINGER**

De fleste af disse metoder er udviklet inden for rammerne af OECD's program for retningslinjer for forsøgsvirksomhed (OECD-Test Guidelines) og bør udføres i overensstemmelse med principperne for god laboratoriepraksis, så der kan opnås størst mulig »gensidig accept af data«.

Yderligere oplysninger kan findes i henvisningerne i OECD-retningslinjerne og relevant litteratur, der er offentliggjort andetsteds.

▼B

B.1. A. **AKUT ORAL TOKSICITET — FASTDOSISMETODEN**

1. **METODE**

Denne forsøgsmetode svarer til OECD TG 420 (2001)

1.1. INDLEDNING

I traditionelle metoder til bestemmelse af akut giftighed anvendes dyrenes død som effektparameter. I 1984 foreslog British Toxicology Society en ny metode til bestemmelse af akut giftighed, baseret på administration af stoffet i en række faste dosisniveauer (1). Med denne metode undgik man at anvende dyrenes død som effektparameter, men støttede sig i stedet til observation for tydelige tegn på toksicitet ved et af en række faste dosisniveauer. Efter in vivo-validering, dels i Det Forenede Kongerige (2), dels internationalt (3), blev metoden indført som forsøgsmetode i 1992. Efterfølgende er de statistiske egenskaber af fastdosismetoden evalueret ved hjælp af matematiske modeller i en række undersøgelser (4)(5)(6). Tilsammen har in vivo-undersøgelser og modelforsøg vist, at metoden er reproducerbar, kræver færre dyr og medfører færre lidelser end traditionelle metoder, og at den gør det muligt at rangordne stofferne på tilsvarende måde som andre metoder til bestemmelse af akut giftighed.

Vejledning i valg af den mest hensigtsmæssige forsøgsmetode til et givet formål kan findes i Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). Samme dokument indeholder desuden supplerende oplysninger om udførelse og fortolkning af forsøg efter metode B.1.A.

Undersøgelsens princip indebærer, at der i hovedundersøgelsen kun anvendes moderat toksiske doser, og at man undgår at administrere doser, som forventes at være dødelige. Ligeledes undgår man at administrere doser, der vides at medføre udtalt smerte og lidelse pga. ætsende eller stærkt irriterende virkning. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant og betragtes ved fortolkningen af forsøgsresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under forsøget, Kriterierne for aflivning af moribunde eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (8).

Metoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at rangordne og klassificere stofferne efter det globale harmoniserede system (GHS) til klassificering af kemiske stoffer med akut toksisk virkning (9).

Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre in vitro- eller in vivo-tokstcitetsundersøgelser af stoffet, toksikologiske data for strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige for til alle parters tilfredshed at godtgøre, at forsøget har betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af passende startdosis.

▼B

1.2. DEFINITIONER

Akut oral toksicitet: de sundhedsmæssigt uønskede virkninger, som optræder efter oral indgift af en enkelt dosis af et teststof eller efter flere doser indgivet i løbet af 24 timer.

Forsinket død: det forhold, at dyret ikke inden for 48 timer dør eller fremtræder moribund, men dør senere inden for den 14 dage lange observationsperiode.

Dosis: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg).

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgift af teststoffet (eksempler herpå findes i (3)), således at der ved den næsthøjeste faste dosis enten kan forventes svære smerter og vedvarende tegn på svære lidelser, moribund status (kriterier herfor er beskrevet i Humane Endpoints Guidance Document (8)), eller størstedelen af dyrene forventes at dø.

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Et fælles projekt mellem OECD (sundhed og miljø), FN's ekspertudvalg vedrørende transport af farligt gods (fysisk-kemiske egenskaber) og ILO (faremærkning og -angivelse), koordineret af Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Overhængende død: det forhold, at moribund tilstand eller død forventes at indtræffe inden næste planlagte observationstidspunkt. Som tegn på denne tilstand i gnavere kan nævnes kramper, sideleje, liggende stilling og tremor.

LD_{50} (middel letaldosis): den statistisk beregnede enkeltdosis af et teststof, som ved oral indgift kan forventes at medføre døden hos 50 % af dyrene, LD_{50}-værdien angives som vægtmængde teststof pr, vægtenhed kropsvægt af forsøgsdyret.

Grænsedosis: en dosis, som danner øvre grænse for testen (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Moribund tilstand: en tilstand, hvor dyret er døende eller ikke vil overleve, selv om det behandles (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (8)).

Forudsigelig død: tilstedeværelse af kliniske tegn, som antyder, at døden vil indtræffe på et kendt tidspunkt før forsøgets planlagte afslutning, f.eks. at dyret er ude af stand til at bevæge sig hen til vand eller føde (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (8)).

▼B

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Grupper af dyr af samme køn modtager trinvis stigende faste doser på 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg (undtagelsesvis kan anvendelse af en yderligere fast dosis på 5 000 mg/kg overvejes, se punkt 1.6.2). På grundlag af en forundersøgelse vælges begyndelsesdosis som den dosis, der forventes at frembringe nogen tegn på toksicitet uden at medføre svær toksisk effekt eller dødelighed. De kliniske tegn og forhold, der er forbundet med smerte, lidelse og forestående død, er detaljeret beskrevet i en separat OECD-vejledning (8). Yderligere grupper af dyr kan behandles med højere eller lavere faste doser. Denne procedure fortsættes, indtil man har fastlagt den dosis, som medfører synlig toksicitet eller højst ét dødsfald, eller der ikke ses nogen effekt af den højeste dosis, eller der optræder dødsfald ved den laveste dosis.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, men en anden gnaverart kan anvendes. Sædvanligvis anvendes hundyr (7). Baggrunden herfor er, at litteraturundersøgelser af konventionelle LD_{50}-forsøg viser, at de to køn sædvanligvis ikke udviser stor forskel i følsomhed, men hvis der er forskel, er hundyr sædvanligvis lidt mere følsomme end handyr (10). Foreligger der imidlertid for strukturelt beslægtede stoffer oplysninger om toksikologiske eller toksikokinetiske egenskaber, som tyder på, at hanner må forventes at være mere følsomme end hunner, bør handyr anvendes. Udføres forsøget i hanner, skal fyldestgørende begrundelse herfor gives.

Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvert dyr skal ved doseringens begyndelse være mellem 8 og 12 uger gammelt, og dets vægt afvige højst ± 20 % fra gennemsnitsvægten af eventuelle tidligere behandlede dyr.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrsrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke være over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes, Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand, Dyrene i en given dosisgruppe kan være anbragt i samme bur, men antallet af dyr i buret må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr.

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

▼B

1.4.4. **Tilberedning af doser**

Sædvanligvis bør teststoffet administreres i samme volumen på alle de anvendte dosisniveauer, idet man varierer koncentrationen i præparatet. Når det færdige testpræparat eller den færdige testblanding er flydende, kan anvendelse af ufortyndet teststof, dvs. med konstant koncentration, være mest relevant for den efterfølgende risikovurdering af stoffet, og nogle myndigheder stiller da også krav herom, I begge tilfælde må det maksimale volumen for indgift ikke overskrides. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse, Til gnavere må rumfanget normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt, ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende 2 ml/100 g kropsvægt. Ved formulering af doseringspræparatets anbefales det så vidt muligt at benytte en vandig opløsning/suspension/emulsion, efterfulgt (i prioriteret rækkefølge) af en opløsning/suspension/emulsion i olie (f.eks, majsolie) og derefter eventuelt en opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt, Doserne skal tilberedes kort før indgift, medmindre præparatets holdbarhed inden for anvendelsesperioden kendes og er godtgjort at være tilfredsstillende.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Administration of doserne**

Teststoffet indgives som enkeltdosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Kan den pågældende stofmængde ikke indgives som enkeltdosis, kan den undtagelsesvis indgives opdelt i få enkelte dele af den samlede dosis over en periode på højst 24 timer.

Dyrene skal være fastende inden doseringen (f.eks. skal rotter natten over ikke have foder, men adgang til vand; mus skal i 3-4 timer ikke have foder, men adgang til vand), Efter fasteperioden vejes dyrene, og teststoffet indgives. Når stoffet er indgivet, kan dyrene unddrages føde i yderligere 3-4 timer for rotter og 1-2 timer for mus. Når en dosis indgives delt over et vist tidsrum, kan det afhængigt af dette tidsrum være nødvendigt at give dyrene foder og adgang til vand.

1.5.2. **Forundersøgelse**

Forundersøgelsen har til formål at bestemme en passende startdosis i hovedundersøgelsen. Teststoffet indgives sekventielt til de enkelte dyr som angivet i skemaerne i bilag 1. Forundersøgelsen afsluttes, når det kan afgøres, hvilken startdosis der skal anvendes i hovedundersøgelsen (eller når der er et dødsfald ved den laveste faste dosis).

Startdosis til forundersøgelsen vælges blandt de faste dosisniveauer 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg som den dosis, der forventes at medføre synlig toksicitet, om muligt baseret på dokumentation i form af in vivo- og in vitro-data for samme kemiske stof og for strukturelt beslægtede stoffer. I mangel af sådanne oplysninger anvendes en startdosis på 300 mg/kg.

Doseringerne af de enkelte dyr finder sted med et interval på mindst 24 timer. Alle dyr observeres i mindst 14 dage.

▼B

Undtagelsesvis, og kun når det kan begrundes konkret ud fra myndighedsregler, kan det overvejes at anvende et supplerende højeste fast dosisniveau på 5 000 mg/kg (se bilag 3). Af dyrevelfærdsmæssige grunde anbefales det at undgå testning i området svarende til 2 000-5 000 mg/kg i GHS kategori 5, og dette bør kun overvejes, når det er overvejende sandsynligt, at resultaterne af et sådant forsøg have direkte relevans for beskyttelsen af menneskers eller dyrs sundhed eller miljøet.

Hvis et dyr dør ved den laveste faste dosis (5 mg/kg) i forundersøgelsen, er fremgangsmåden normalt at standse forsøget og indplacere stoffet i GHS kategori 1 (som vist i bilag 1). Hvis klassificeringen kræves nærmere bekræftet, kan man dog frivilligt vælge følgende supplerende procedure: Endnu et dyr doseres med 5 mg/kg. Hvis dette dyr dør, vil det bekræfte GHS kategori 1, og undersøgelsen standses straks. Hvis dyret overlever, kan yderligere højst tre dyr behandles med 5 mg/kg. På grund af den høje dødsrisiko bør disse dyr af dyrevelfærdsmæssige grunde doseres sekventielt. Tidsrummet mellem doseringen af de enkelte dyr skal være tilstrækkeligt til at fastslå, at det foregående dyr må forventes at overleve. Indtræffer der endnu et dødsfald, skal doseringen straks indstilles, og ingen yderligere dyr doseres, Da optræden af endnu et dødsfald (uanset det testede antal dyr på ophørstidspunktet) falder ind under udfald A (to eller flere dødsfald), følger man klassificeringsreglen i bilag 2 ved fast dosis 5 mg/kg (dvs. kategori 1. hvis der er to eller flere dødsfald, og kategori 2 hvis der er højst et dødsfald), Derudover indeholder bilag 4 vejledning i, hvordan man foretager klassificeringen i EU's system, indtil det nye GHS er indført.

1.5.3. **Hovedundersøgelsen**

1.5.3.1. *Antal dyr og dosisniveauer*

De enkelte trin, der skal følges efter testning ved startdosis, er angivet i skemaerne i bilag 2. Der skal vælges en af følgende tre muligheder: enten afbrydelse af forsøget og tilordning af stoffet til den pågældende fareklasse, eller testning ved et højere fast dosisniveau, eller testning ved et lavere fast dosisniveau. Af hensyn til dyrenes beskyttelse vil et dosisniveau, der medførte død i forundersøgelsen, ikke blive gentaget i hovedundersøgelsen (se bilag 2). Erfaringen viser, at det mest sandsynlige udfald ved startdosisniveauet er, at stoffet kan klassificeres, uden at yderligere testning er nødvendig.

For hvert af de undersøgte dosisniveauer vil der normalt blive anvendt i alt fem dyr af ét køn. De fem dyr består af det dyr fra forundersøgelsen, som blev doseret ved det valgte dosisniveau, samt yderligere fire dyr (undtagen når et af hovedundersøgelsens dosisniveauer undtagelsesvis ikke indgik i forundersøgelsen).

Tidsintervallet mellem doseringerne på hvert niveau bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Behandlingen af dyrene ved næste dosering skal vente, indtil det kan antages, at de tidligere doserede dyr vil overleve. Det anbefales, at man om nødvendigt lader gå 3-4 dage mellem doseringerne på hvert dosisniveau for at få den nødvendige tid til at iagttage en eventuel forsinket toksisk virkning. Tidsintervallet kan korrigeres til en passende størrelse, f.eks. hvis den opnåede respons er inkonklusiv.

▼B

Overvejes det at anvende en fast højeste dosis på 5 000 mg/kg, følger man proceduren i bilag 3 (se også punkt 1.6.2).

1.5.3.2. *Grænsetest*

Grænsetesten anvendes fortrinsvis i situationer, hvor forsøgslederen har oplysninger om, at teststoffet må forventes at være atoksisk, dvs, kun er toksisk i doser over de grænsedoser, der er fastsat i bestemmelserne. Oplysninger om teststoffets giftighed kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller tilsvarende testede blandinger eller produkter, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning, Når der foreligger få eller slet ingen oplysninger om teststoffets toksicitet, eller når stoffet forventes at være toksisk, skal hovedundersøgelsen udføres.

Når den normale fremgangsmåde følges, vil en startdosis ved forundersøgelsen på 2 000 mg/kg (eller undtagelsesvis 5 000 mg/kg) efterfulgt af en dosering af fire yderligere dyr tjene som grænsetest med henblik på denne guideline.

1.6. OBSERVATIONER

Efter doseringen iagttages dyrene enkeltvis mindst én gang i de første 30 minutter, og periodisk de første 24 timer, under særlig opmærksomhed de første 4 timer, derefter dagligt, gennem i alt 14 dage, bortset fra tilfælde, hvor dyrene må tages ud af undersøgelsen og aflives humant af dyrevelfærdsmæssige grunde eller findes døde. Imidlertid bør observationsperioden ikke fastsættes ufravigeligt, Den bør fastlægges ud fra de toksiske reaktioners indsætten og restitutionsperiodens længde og kan således forlænges, når det skønnes nødvendigt. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer (11), Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr.

Viser dyrene fortsat tegn på toksicitet, vil supplerende observationer være nødvendige. Observationerne skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem, samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Humane Endpoints Guidance Document, skal ligeledes tages i betragtning (8). Dyr, som findes at være moribunde, og dyr, som udviser svære smerter eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

1.6.1. **Kropsvægt**

Vægten af hvert enkelt dyr bestemmes kort før indgift af teststoffet og derefter mindst én gang om ugen. Vægtændringer beregnes og registreres. Ved forsøgets slutning vejes de overlevende dyr, som derefter aflives humant.

▼B

1.6.2. **Patologi**

Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr. For dyr, som overlever i 24 timer eller længere efter den første dosering, kan man endvidere overveje mikroskopisk undersøgelse af organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer, da dette kan give nyttige oplysninger.

2. **DATA**

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover opstilles i tabelform for hver forsøgsgruppe oplysninger om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet, samt obduktionsfund.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Teststof:

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsdata, herunder CAS-nummer.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— dyrenes antal, alder og køn (og, i givet fald, begrundelse for brug af handyr i stedet for hundyr)

— oprindelse, opstaldning, foder osv.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende teststoffets formulering, herunder beskrivelse af den fysiske tilstand af det indgivne materiale

— oplysninger om administrationen af teststoffet, herunder doseringsvolumen og doseringstidspunkt

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder foderets art og oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af startdosis.

▼B

Resultater:

— opstilling i tabelform af effekter og dosisniveau for hvert dyr (dvs, dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed og varighed)

— opstilling i tabelform af kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— de enkelte dyrs vægt på doseringsdagen, derefter med én uges mellemrum, samt på døds- eller aflivningstidspunktet

— dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før den planlagte aflivning

— for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr, obduktionsfund og, i givet fald, histopatologiske fund.

Diskussion og fortolkning af resultater.

Konklusioner,

4. **HENVISNINGER**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicitiy (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel. M.J., Dayan. A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Petling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002), Statistical evaluation of the revised fixed dose procediire.-Hum, Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

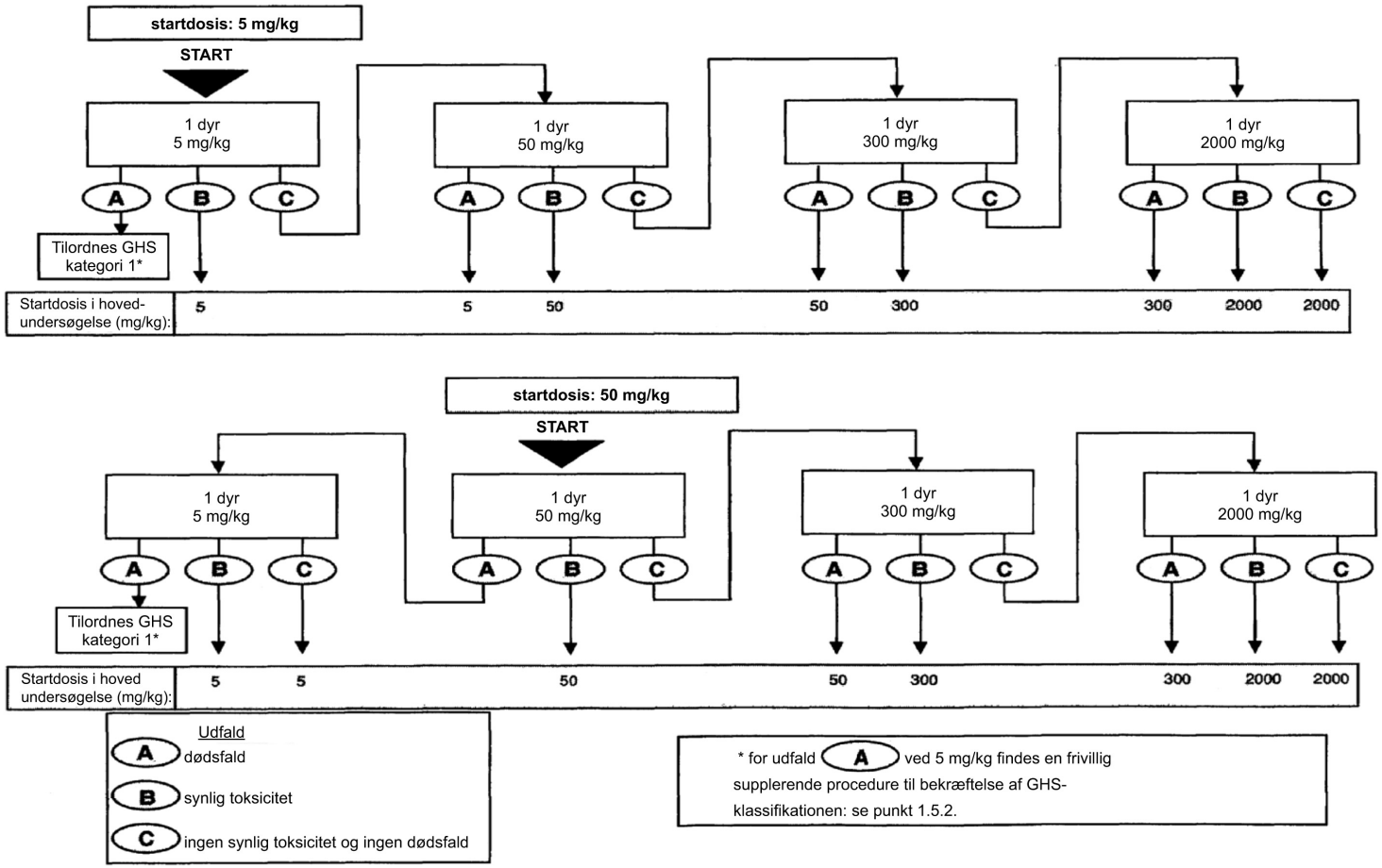
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.ll [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

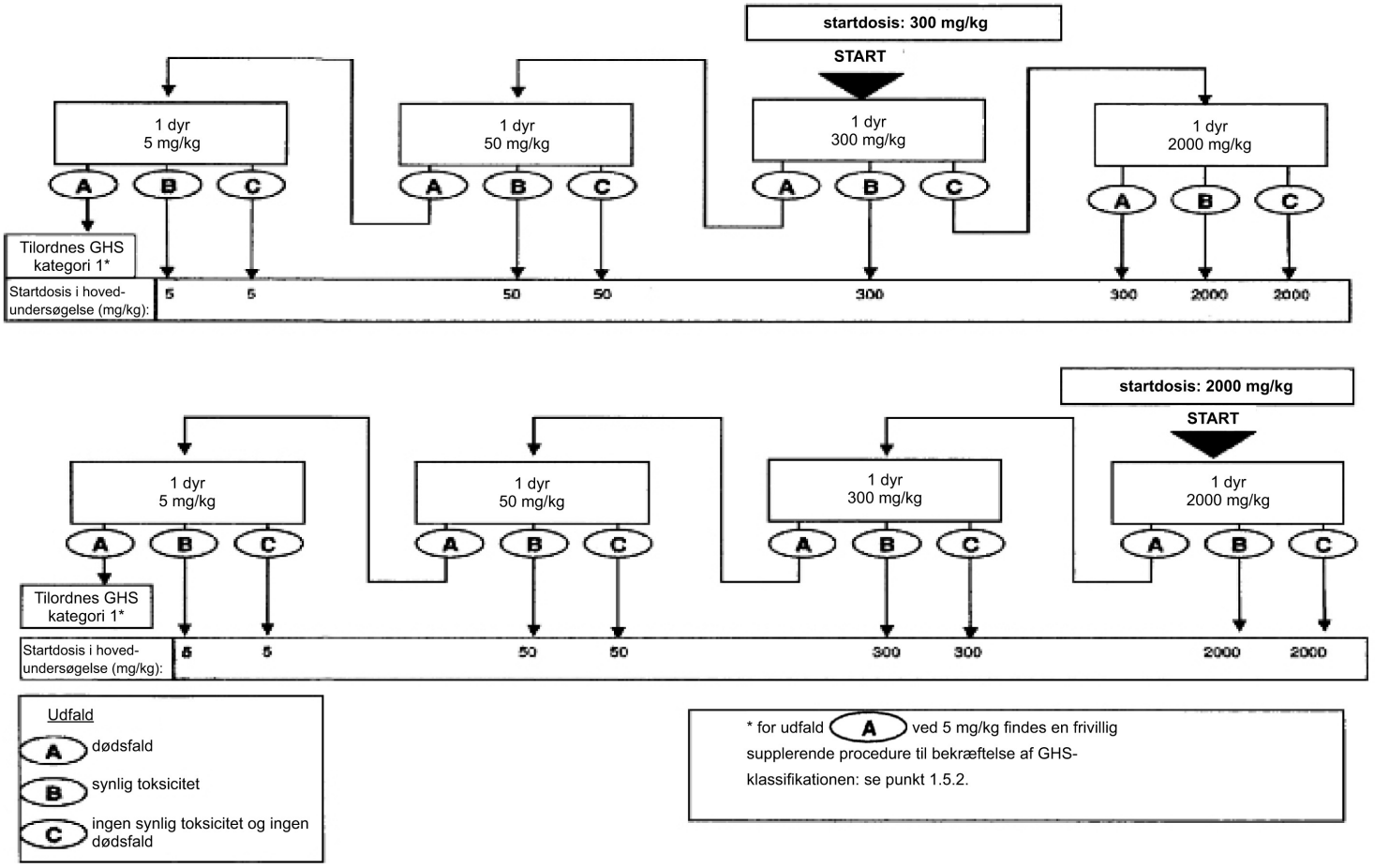
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Haves (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd New York, USA.

BILAG 1

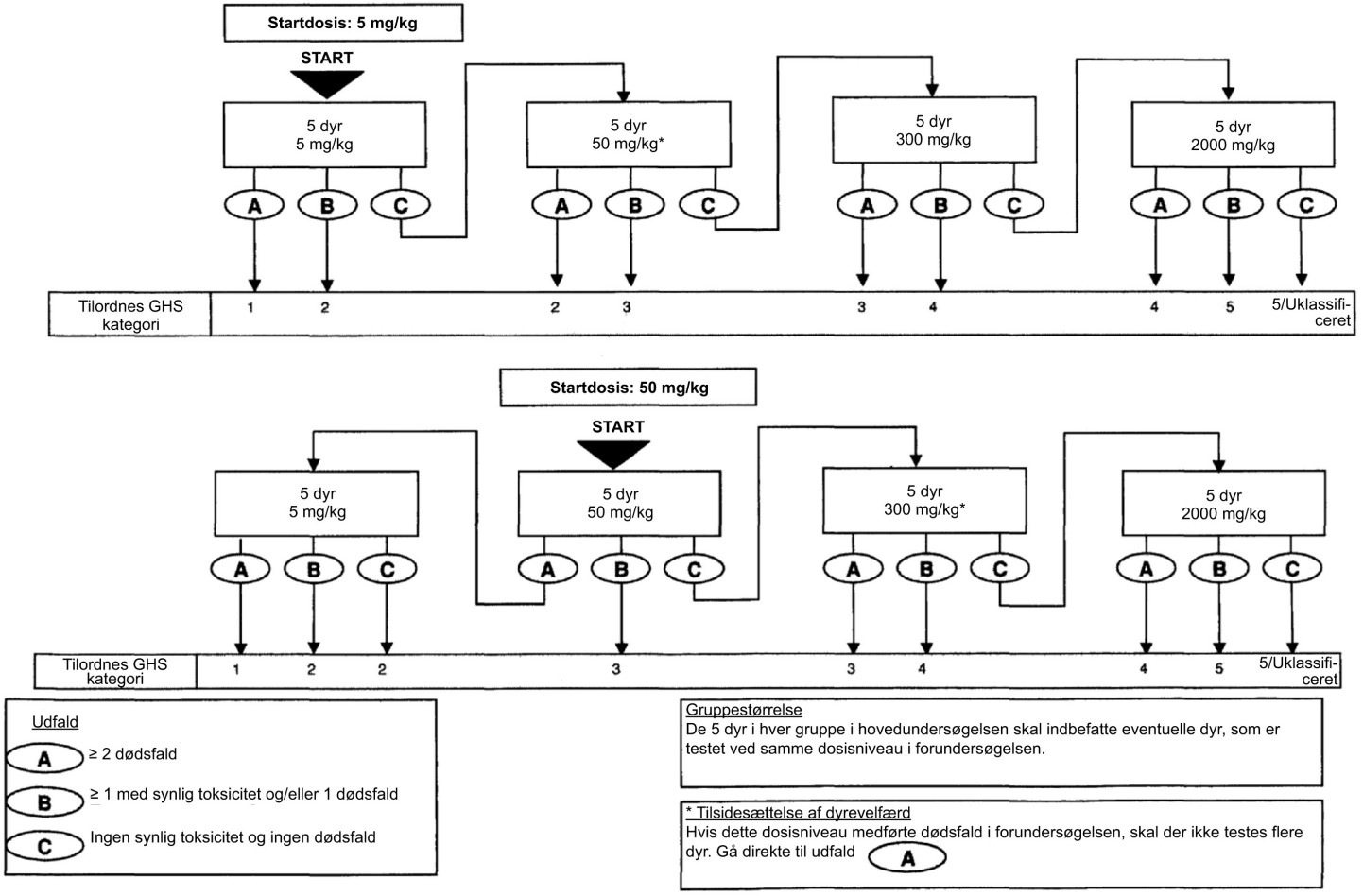
FREMGANGSMÅDE VED FORUNDERSØGELSEN



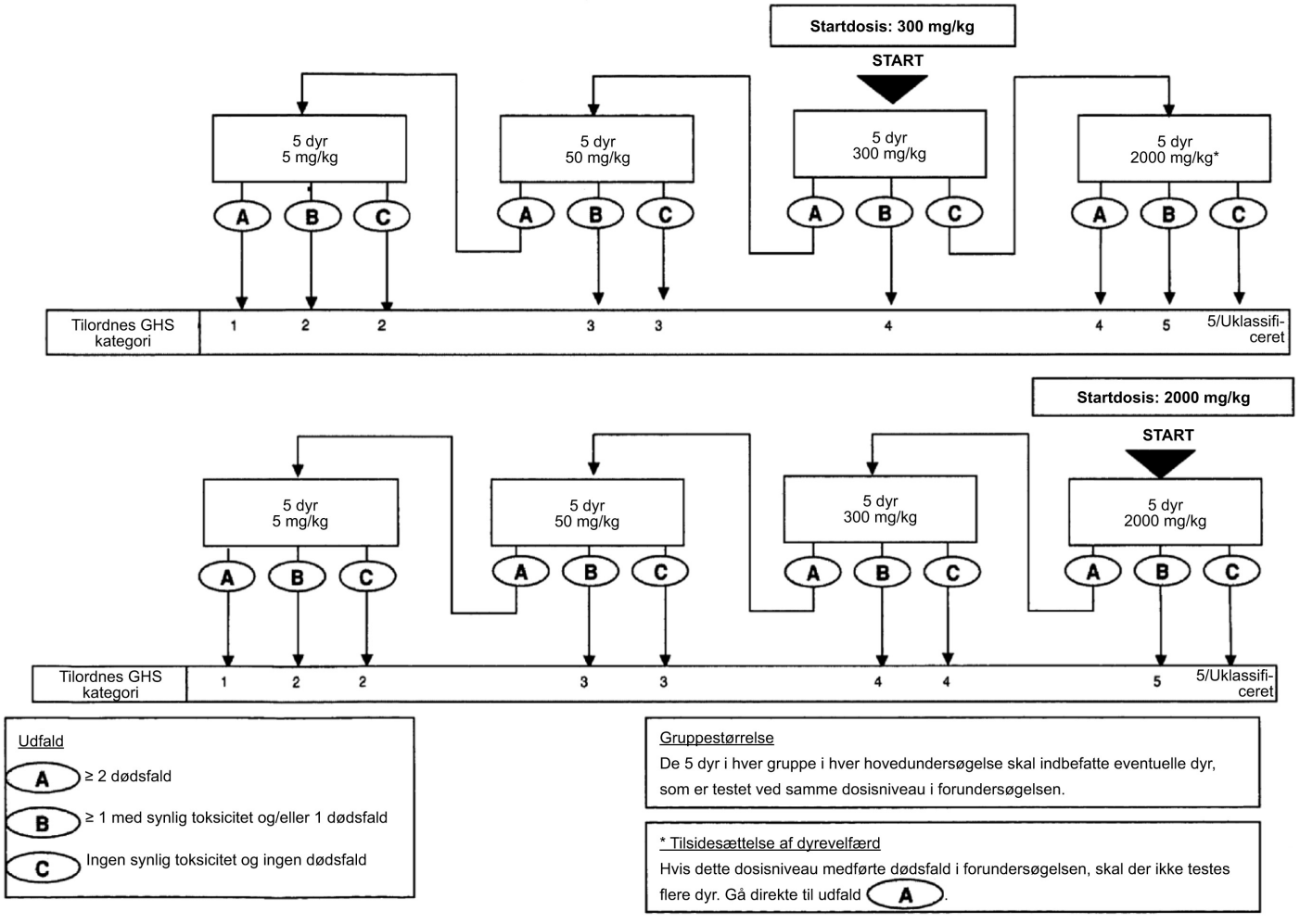

startdosis: 300 mg/kg
START
1 dyr
5 mg/kg
1 dyr
50 mg/kg
1 dyr
300 mg/kg
1 dyr
2000 mg/kg
A
B
C
Tilordnes GHS kategori 1*
Startdosis i hoved-undersøgelse (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
startdosis: 2000 mg/kg
START
1 dyr
5 mg/kg
1 dyr
50 mg/kg
1 dyr
300 mg/kg
1 dyr
2000 mg/kg
Tilordnes GHS kategori 1*
Startdosis i hoved-undersøgelse (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Udfald
A dødsfald
B synlig toksicitet
C ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
* for udfald A ved 5 mg/kg findes en frivillig supplerende procedure til bekræftelse af GHS-klassifikationen: se punkt 1.5.2.

BILAG 2

FREMGANGSMÅDE VED HOVEDUNDERSØGELSEN



▼B


Startdosis: 300 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg*
A
B
C
Tilordnes GHS kategori
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Uklassificeret
Startdosis: 2000 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg
Udfald
A ≥ 2 dødsfald
B ≥ 1 med synlig toksicitet og/eller 1 dødsfald
C Ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
Gruppestørrelse
De 5 dyr i hver gruppe i hver hovedundersøgelse skal indbefatte eventuelle dyr, som er testet ved samme dosisniveau i forundersøgelsen.
* Tilsidesættelse af dyrevelfærd
Hvis dette dosisniveau medførte dødsfald i forundersøgelsen, skal der ikke testes flere dyr. Gå direkte til udfald A.

▼B

BILAG 3

KRITERIER FOR KLASSIFICERING AF TESTSTOFFER MED FORVENTET LD_{50}-VÆRDI OVER 2 000 MG/KG, UDEN AT TESTNING ER NØDVENDIG

Kriterierne for farekategori 5 skal give mulighed for at udpege teststoffer, som udviser relativ risiko for akut gifitighed, men som under visse omstændigheder kan udgøre en fare for følsomme populationer. For disse stoffer forventes en oral eller dermal LD_{50} i området 2 000-5 000 mg/kg, eller tilsvarende doser for andre administrationsveje, I følgende tilfælde kan et teststof klassificeres i farekategorien defineret ved: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategori 5 i GHS):

a) hvis de kan tilordnes denne kategori i henhold til enhvert af skemaerne i bilag 2 på grundlag af dødsfrekvensen

b) hvis foreliggende pålidelige oplysninger viser, at LD_{50} ligger i området svarende til kategori 5, eller hvis andre dyreundersøgelser eller toksiske virkninger i mennesker viser, at der er grund til stærke sundhedsmæssige betænkeligheder

c) ved ekstrapolation, skønsmæssig beregning eller måling af data, når der ikke er grundlag for at tilordne stoffet til en farligere klasse, og

— foreliggende pålidelige oplysninger viser betydelig toksisk virkning på mennesker, eller

— der iagttages dødelighed ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 ved oral administration, eller

— ekspertvurderinger bekræfter, at der er væsentlige kliniske tegn på toksicitet ved testning op til værdierne svarende til kategori 4, bortset fra diarré, pilorektion eller uplejet udseende af pels, eller

— ekspertvurderinger bekræfter pålidelige oplysninger om potentiale for væsentlige akutte virkninger i de andre dyreforsøg.

TESTNING VED DOSER OVER 2 000 MG/KG

Et supplerende øvre fast dosisniveau på 5 000 mg/kg kan undtagelsesvis overvejes, når konkrete myndighedsbestemmelser gør det nødvendigt. Dyrevelfærdsmæssige grunde taler imod testning af dyr ved 5 000 mg/kg, og et sådant forsøg bør kun overvejes, når dets resultater med overvejende sandsynlighed vil få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed (9),

Forundersøgelse

Reglerne i bilag 1 for anvendelse af den sekventielle metode udvides til at omfatte dosisniveauet 5 000 mg/kg. Når startdosis i forundersøgelsen er 5 000 mg/kg, vil udfald A (død) kræve testning af endnu et dyr ved 2 000 mg/kg; udfald B og C (synlig toksicitet eller ingen toksicitet) vil tillade, at 5 000 mg/kg vælges som startdosis i hovedundersøgelsen. Tilsvarende gælder, at hvis der anvendes en anden startdosis end 5 000 mg/kg, skal forsøget udvides til 5 000 mg/kg i tilfælde af udfald B eller C ved 2 000 mg/kg; fås derefter udfald A ved 5 000 mg/kg, skal startdosis i hovedundersøgelsen være 2 000 mg/kg, og fås udfald B og C, skal startdosis i hovedundersøgelsen være 5 000 mg/kg

▼B

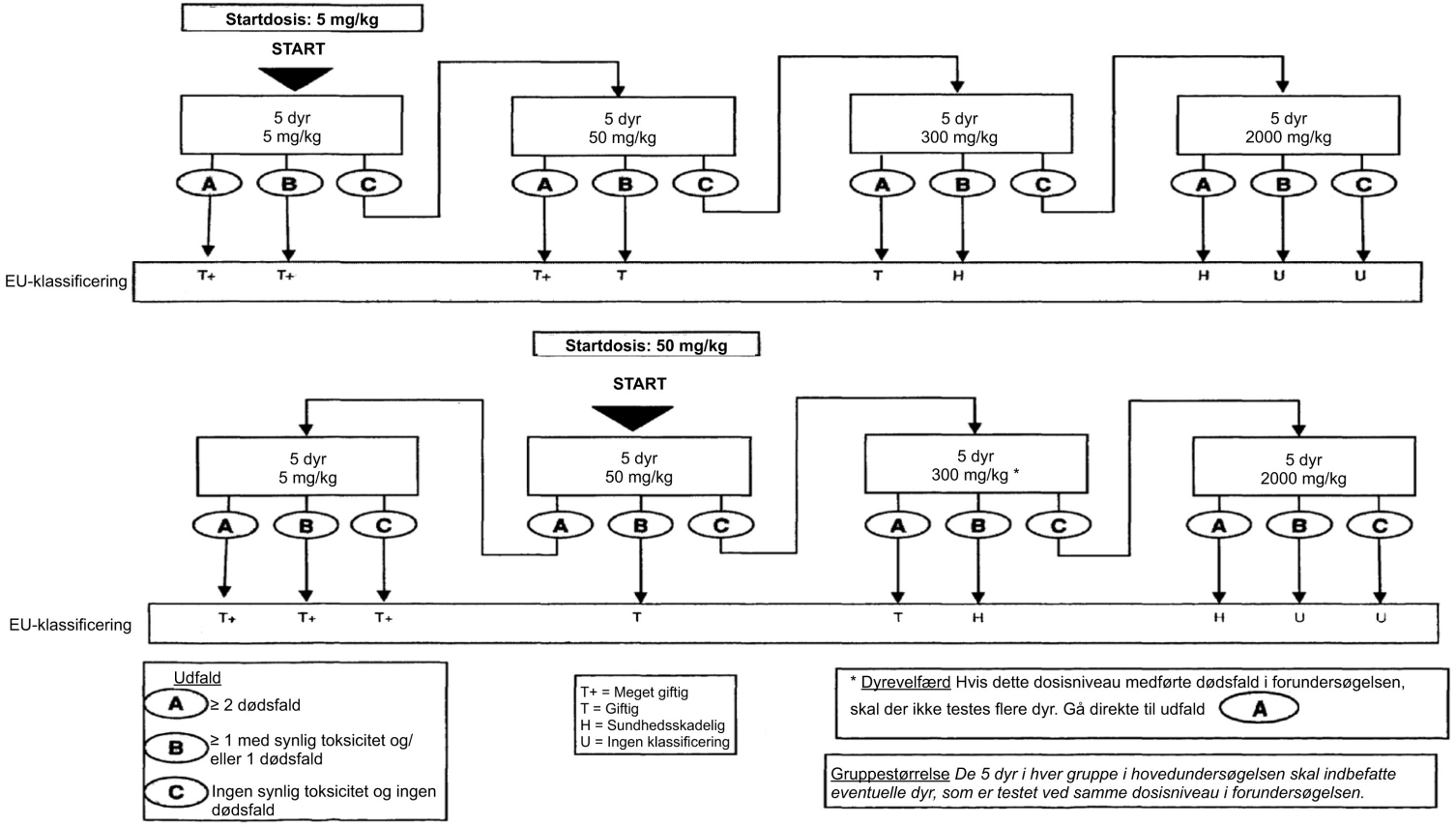
Hovedundersøgelse

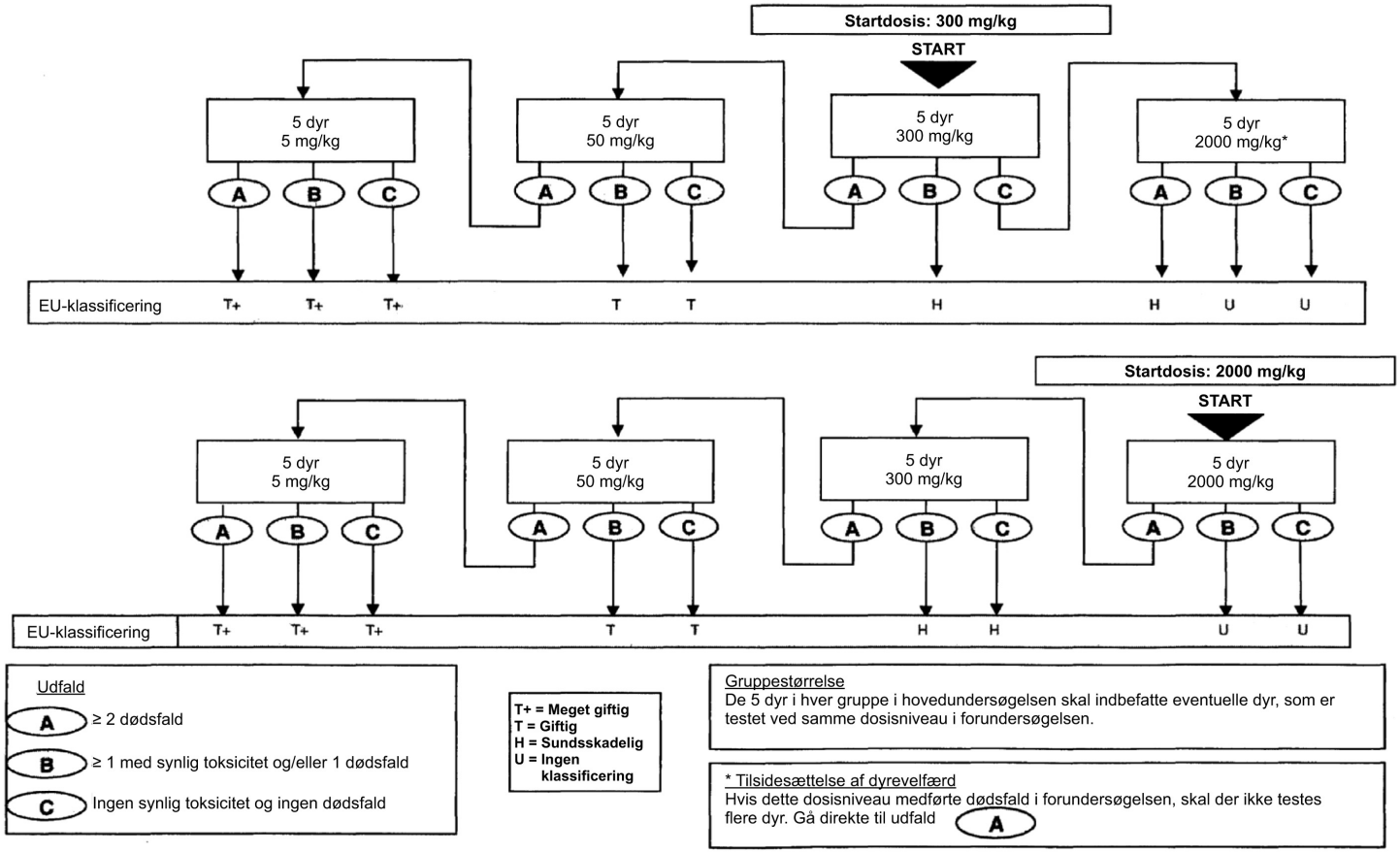
Reglerne i bilag 2 for anvendelse af den sekventielle metode udvides til at omfatte dosisniveauet 5 000 mg/kg, Når startdosis i forundersøgelsen er 5 000 mg/kg, vil udfald A (≥ 2 dødsfald) kræve testning af endnu en gruppe ved 2 000 mg/kg; udfald B (synlig toksicitet og/eller ≤ 1 dødsfald) eller C (ingen toksicitet) vil medføre, at stoffet ikke skal klassificeres i henhold til GHS. Tilsvarende gælder, at hvis der anvendes en anden startdosis end 5 000 mg/kg, vil forsøget blive udvidet til 5 000 mg/kg i tilfælde af udfald C ved 2 000 mg/kg; et efterfølgende udfald A ved 5 000 mg/kg vil placere stoffet i GHS kategori 5, mens udfald B eller C vil medføre, at stoffet ikke skal klassificeres.

BILAGÂ 4

TESTMETODE B.l a

Vejledning i klassificering efter EU-systemet i overgangsperioden indtil fuld gennemfÃ‚relse af det globale harmoniserede klassifikationssystem (GHS) (fra henvisning (8))




Startdosis: 300 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg*
A
B
C
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Startdosis: 2000 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Udfald
A ≥ 2 dødsfald
B ≥ 1 med synlig toksicitet og/eller 1 dødsfald
C Ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
T+ = Meget giftig
T = Giftig
H = Sundsskadelig
U = Ingen klassificering
Gruppestørrelse
De 5 dyr i hver gruppe i hovedundersøgelsen skal indbefatte eventuelle dyr, som er testet ved samme dosisniveau i forundersøgelsen.
* Tilsidesættelse af dyrevelfærd
Hvis dette dosisniveau medførte dødsfald i forundersøgelsen, skal der ikke testes flere dyr. Gå direkte til udfald A

▼B

B.1.B. **AKUT ORAL TOKSICITET — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN**

1. **METODE**

Metoden svarer til OECD TG 423 (2001).

1.1. INDLEDNING

Akut toksisitetsklassemetoden (1) er en trinvis metode, hvor der anvendes tre dyr af samme køn på hvert trin. Afhængigt af dyrenes dødelighed og/eller moribunde tilstand kræves i gennemsnit 2-4 trin til vurdering af den akutte toksicitet af et teststof. Metoden er reproducerbar, kræver meget få dyr og gør det muligt at vurdere stofferne efter giftighed på tilsvarende måde som andre metoder til bestemmelse af akut toksicitet. Akut toksicitetsklassemetoden bygger på biometriske vurderinger (2)(3)(4)(5) med faste doser, der er spredt således, at et stofs giftighed kan bestemmes med henblik på klassificering og risikovurdering, Metoden blev indført i 1996 og er blevet grundigt valideret in vivo over for LD_{50}-data fra litteraturen, både nationalt (6) og internationalt (7).

Vejledning i valg af den mest hensigtsmæssige forsøgsmetode til et givet formål kan findes i Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). Samme dokument indeholder desuden supplerende oplysninger om udførelse og fortolkning af forsøg efter metode B.1.B.

Man behøver ikke indgive stofferne i doser, der vides at medføre udtalt smerte og lidelse på grund af ætsende eller stærkt irriterende virkning. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant og betragtes ved fortolkningen af forsøgsresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under forsøget. Kriterierne for aflivning af moribunde eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (9).

Metoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at vurdere stofferne efter giftighed og klassificere stofferne efter det globale harmoniserede system (GHS) til klassificering af kemiske stoffer med akut toksisk virkning (10).

I princippet er metoden ikke beregnet til bestemmelse af en nøjagtig LD_{50}-værdi, men giver mulighed for at fastlægge nogle eksponeringsintervaller, inden for hvilke der forventes dødelighed, idet død af en del af dyrene fortsat er testens vigtigste effektparameter. For at en LD_{50}-værdi kan bestemmes med metoden, skal mindst to dosisniveaer resultere i større dødelighed end 0 % og lavere end 100 %. Ved at benytte en række på forhånd fastlagte doser, uafhængigt af teststoffet, og ved eksplicit at basere klassifikationen på antal dyr, der observeres i forskellige tilstande, får laboratoriet bedre mulighed for at opnå sammenhængende og repeterbare resultater.

▼B

Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo og in vitro toksicitetsundersøgelser af stoffet, toksikologiske data for strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige, for at det til alle parters tilfredshed kan godtgøres, at forsøget har betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af den bedst egnede startdosis.

1.2. DEFINITIONER

Akut oral toksicitet: de sundhedsmæssigt uønskede virkninger, som optræder efter oral indgift af en enkelt dosis af et stof eller efter flere doser indgivet i løbet af 24 timer.

Forsinket død: det forhold, at dyret ikke inden for 48 timer dør eller fremtræder moribund, men dør senere inden for den 14 dage lange observationsperiode.

Dosis: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Et tælles projekt mellem OECD (sundhed og miljø), FN's ekspertudvalg vedrørende transport af farligt gods (fysisk-kemiske egenskaber) og ILO (faremærkning og -angivelse) koordineret af Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Overhængende død: det forhold, at moribund tilstand eller død forventes at indtræffe inden næste planlagte observationstidspunkt. Som tegn på denne tilstand i gnavere kan nævnes kramper, sideleje, liggende stilling og tremor (Se nærmere i Humane End point Guidance Document (9)).

LD_{50} (middel oral letaldosis): den statistisk beregnede enkeltdosis af et teststof, som ved oral indgift kan forventes at medføre døden hos 50 % af dyrene. LD_{50}-værdien angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed kropsvægt af forsøgsdyret (mg/kg).

Grænsedosis: en dosis, som danner øvre grænse for testen (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Moribund tilstand: en tilstand, hvor dyret er døende eller ikke vil overleve, selv om det behandles (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (9)).

Forudsigelig død: tilstedeværelse af kliniske tegn. Som antyder, at døden vil indtræffe på et kendt tidspunkt før forsøgets planlagte afslutning; f.eks. at dyret er ude af stand til at bevæge sig hen til vand eller føde (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Metoden bygger på en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes det mindst mulige antal dyr, og man opnår tilstrækkelig information om teststoffets akutte giftighed til, at det kan klassificeres. Stoffet gives oralt til en gruppe forsøgsdyr ved en af de fastlagte doser. Stoffet testes ved en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes tre dyr af samme køn (normalt hunner). Stofrelateret dødelighed (eller fravær heraf) af de behandlede dyr på det ene trin bestemmer næste trin, dvs.:

— ingen yderligere testning nødvendig

— dosering af yderligere tre dyr med samme dosis

— dosering af yderligere tre dyr på næste højere eller lavere dosisniveau.

Detaljer vedrørende testmetoden er beskrevet i bilag 1. Metoden giver mulighed for vurdering af stoffets klassificering i en af de toksicitetsklasser, der er bestemt ved fast afgrænsede LD_{50}-værdier.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, men andre gnaverarter kan anvendes. Sædvanligvis anvendes hundyr (9). Baggrunden herfor er, at litteraturundersøgelser af konventionelle LD_{50}-forsøg viser, at de to køn sædvanligvis ikke udviser stor forskel i følsomhed, men hvis der er forskel, er hundyr sædvanligvis lidt mere følsomme end handyr (11). Foreligger der imidlertid for strukturelt beslægtede stoffer toksikologiske eller toksikokinetiske oplysninger, som tyder på, at hanner må forventes at være mere følsomme end hunner, bør handyr anvendes. Udføres forsøget i hanner, skal fyldestgørende begrundelse herfor gives.

Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvert dyr skal ved doseringens begyndelse være mellem 8 og 12 uger gammelt, og dets vægt afvige højst ± 20 % fra gennemsnitsvægten af eventuelle tidligere doserede dyr.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke være over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Dyrene i en given dosisgruppe kan være anbragt i samme bur, men antallet af dyr i buret må ikke vanskeliggøre observation af de enkelte dyr.

▼B

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst 5 døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

1.4.4. **Tilberedning af doser**

Sædvanligvis anvendes samme volumen til indgift af teststoffet på alle de anvendte dosisniveauer, idet man varierer koncentrationen i det indgivne præparat. Er det færdige produkt eller den færdige blanding flydende, kan anvendelse af ufortyndet teststof, dvs. med konstant koncentration, være mest relevant for den efterfølgende risikovurdering af stoffet, og af nogle myndigheder stilles da også krav herom. I begge tilfælde må det maksimale volumen for indgift ikke overskrides. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse. Til gnavere må rumfanget normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt. ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende 2 ml/100 g kropsvægt. Ved formulering af doseringspræparatet anbefales det så vidt muligt at benytte en vandig opløsning/suspension/emulsion, efterfulgt (i prioriteret rækkefølge) af en opløsning/suspension/emulsion i olie (f.eks. majsolie) og derefter eventuelt en opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Doserne skal tilberedes kort før indgift, medmindre præparatets holdbarhed inden for anvendelsesperioden kendes og er godtgjort at være tilfredsstillende.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Administration of doserne**

Teststoffet indgives ved gavage som én enkelt dosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Er det ikke muligt at indgive den pågældende stofmængde som en enkelt dosis, kan den undtagelsesvis undtagelsesvis indgives opdelt i få enkelte dele af den samlede dosis over en periode på højst 24 timer.

Dyrene skal være fastende inden doseringen (f.eks. skal rotter natten over ikke have foder, men adgang til vand. mus skal i 3-4 timer ikke have foder, men adgang til vand). Efter fasteperioden vejes dyrene, og teststoffet indgives, Når stoffet er indgivet, kan dyrene unddrages føde i yderligere 3-4 timer for rotter og 1-2 timer for mus. Når en dosis indgives delt over et vist tidsrum, kan det alt efter dette tidsrum være nødvendigt at give dyrene foder og adgang til vand.

1.5.2. **Antal dyr og dosisniveauer**

Der anvendes tre dyr til hvert trin. Som startdosis anvendes et af fire faste niveauer, 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg kropsvægt. Som startdosis skal anvendes den, der med størst sandsynlighed forventes at fremkalde dødelighed i nogle af de doserede dyr. I skemaerne i bilag 1 beskrives den procedure, der skal følges for hver startdosis. Derudover giver bilag 4 vejledning i, hvordan man foretager klassificeringen i EU's system, indtil det nye GHS er indført.

▼B

Når de foreliggende oplysninger tyder på, at der næppe kan forventes dødelighed ved den højeste startdosis (2 000 mg/kg kropsvægt), skal der udføres en grænsetest. Når der ikke foreligger nogen oplysninger om teststoffet, anbefales 300 mg/kg kropsvægt som startdosis af dyrevelfærdsmæssige grunde.

Tidsintervallet mellem doseringerne på hvert niveau bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Behandlingen af dyrene ved næste dosering skal vente, indtil det er sikkert, at de tidligere doserede dyr vil overleve.

Undtagelsesvis, og kun når det kan begrundes konkret ud fra myndighedsregler, kan det overvejes at anvende et supplerende højeste fast dosisniveau på 5 000 mg/kg (se bilag 2), Af dyrevelfærdsmæssige grunde anbefales det at undgå testning i området svarende til GHS-kategori 5 (2 000-5 000 mg/kg), som kun bør overvejes, når resultaterne af et sådant forsøg med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed eller miljøet.

1.5.3. **Grænsetest**

Grænsetesten anvendes fortrinsvis i situationer, hvor forsøgslederen har oplysninger om, at teststoffet må forventes at være atoksisk, dvs. kun er toksisk i doser over de grænsedoser, der er fastsat i bestemmelserne. Oplysninger om teststoffets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller tilsvarende testede blandinger eller produkter, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om teststoffets toksicitet, eller når stoffet forventes at være toksisk, bør hovedundersøgelsen udføres.

Der kan udføres en grænsetest ved ét dosisniveau på 2 000 mg/kg kropsvægt med seks dyr (tre dyr på hvert trin). Undtagelsesvis kan der i grænsetesten anvendes et dosisniveau på 5 000 mg/kg kropsvægt med tre dyr (se bilag 2). Hvis dette medfører teststofrelateret mortalitet, kan yderligere testning på næste lavere dosisniveau være nødvendig.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen iagttages dyrene enkeltvis mindst én gang i de første 30 minutter, og periodisk de første 24 timer, under særlig opmærksomhed de første 4 timer, derefter dagligt, gennem i alt 14 dage, bortset fra tilfælde, hvor dyrene må tages ud af undersøgelsen og aflives humant af dyrevelfærdsmæssige grunde eller findes døde. Imidlertid bør observationsperioden ikke fastsættes ufravigeligt. Den fastlægges ud fra de toksiske reaktioners indsætten og restitutionsperiodens længde og kan således forlænges, når det skønnes nødvendigt. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer (12). Alle observationer registreres systematisk i og der føres individuel protokol for hvert dyr.

▼B

Viser dyrene fortsat tegn på toksicitet, vil supplerende observationer være nødvendige, Observationerne skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonome nervesystem og centralnervesystem, samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og coma. Ligeledes skal der tages hensyn til principperne og kriterierne i Humane Endpoints Guidance Document (9). Dyr, som findes at være moribunde, og dyr, som udviser svære smerter eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

1.6.1. **Kropsvægt**

Vægten af hvert enkelt dyr bestemmes kort før indgift af teststoffet og derefter mindst én gang om ugen. Vægtændringer beregnes og registreres. Ved forsøgets slutning vejes de overlevende dyr, som derefter aflives humant.

1.6.2. **Patologi**

Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr. Endvidere kan det overvejes at foretage mikroskopisk undersøgelse af organer, som udviser makroskopiske forandringer, da dette kan give nyttige oplysninger.

2. **DATA**

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover opstilles i tabelform for hver forsøgsgruppe antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet, samt obduktionsfund.

3. **RAPPORTERING**

3.1. **Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

For teststoffet:

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsdata, herunder CAS-nummer.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

▼B

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— dyrenes antal, alder og køn (og, i givet fald, begrundelse for brug af handyr i stedet for hundyr)

— oprindelse, opstaldning, foder osv.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende teststoffets formulering, herunder beskrivelse af det indgivne materiales fysiske tilstand;

— oplysninger om administrationen af teststoffet, herunder doseringsvolumen og doseringstidspunkt:

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder foderets art og oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af startdosis.

Resultater:

— opstilling i tabelform af effekter og dosisniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet; og virkningernes art, sværhed og varighed)

— opstilling i tabelform af kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— de enkelte dyrs vægt på doseringsdagen, derefter med én uges mellemrum, samt på døds- eller aflivningstidspunktet

— dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før den planlagte aflivning

— for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr, obduktionsfund og, i givet fald, histopatologiske fund.

Diskussion og fartolkning af resultater.

Konklusioner.

4. **HENVISNINGER**

(1) Roll R., Hiifer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschlager M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität van Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Tosic- Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R.L, Cotnivo. J.A, Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walter A.P. Chu I: Goddard M, Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles und Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

BILAG 1

FREMGANGSMÅDE, SOM SKAL FØLGES FOR HVER STARTDOSIS

GENERELLE BEMÆRKNINGER

For hver startdosis er anvist korrekt fremgangsmåde i den pågældende forsøgsplan i dette bilag.

— Bilag 1 A: Startdosis er 5 mg/kg kropsvægt

— Bilag 1 B: Startdosis er 50 mg/kg kropsvægt

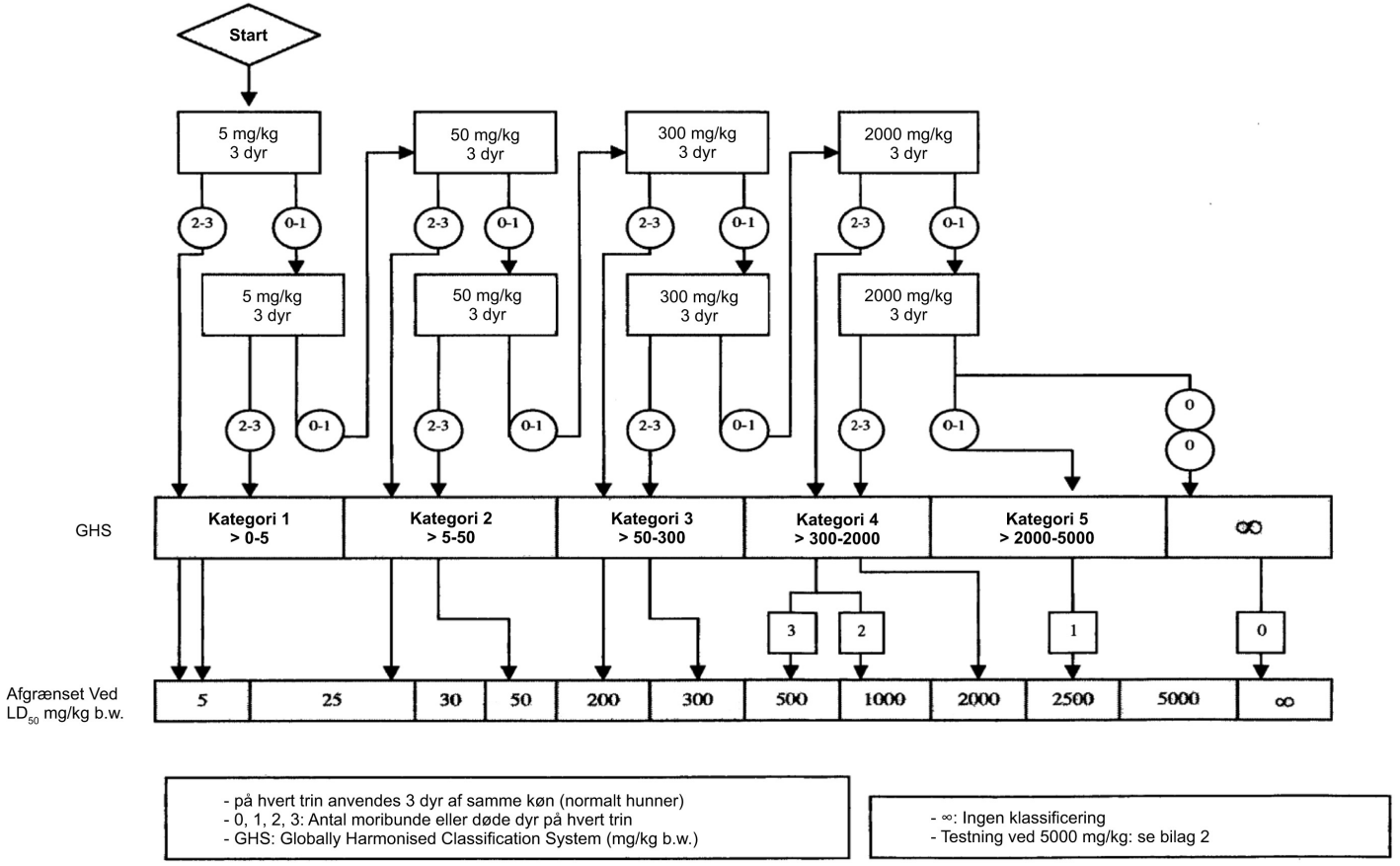
— Bilag 1 C: Startdosis er 300 mg/kg kropsvægt

— Bilag 1 D: Startdosis er 2 000 mg/kg kropsvægt

Ved forsøgsgangen følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

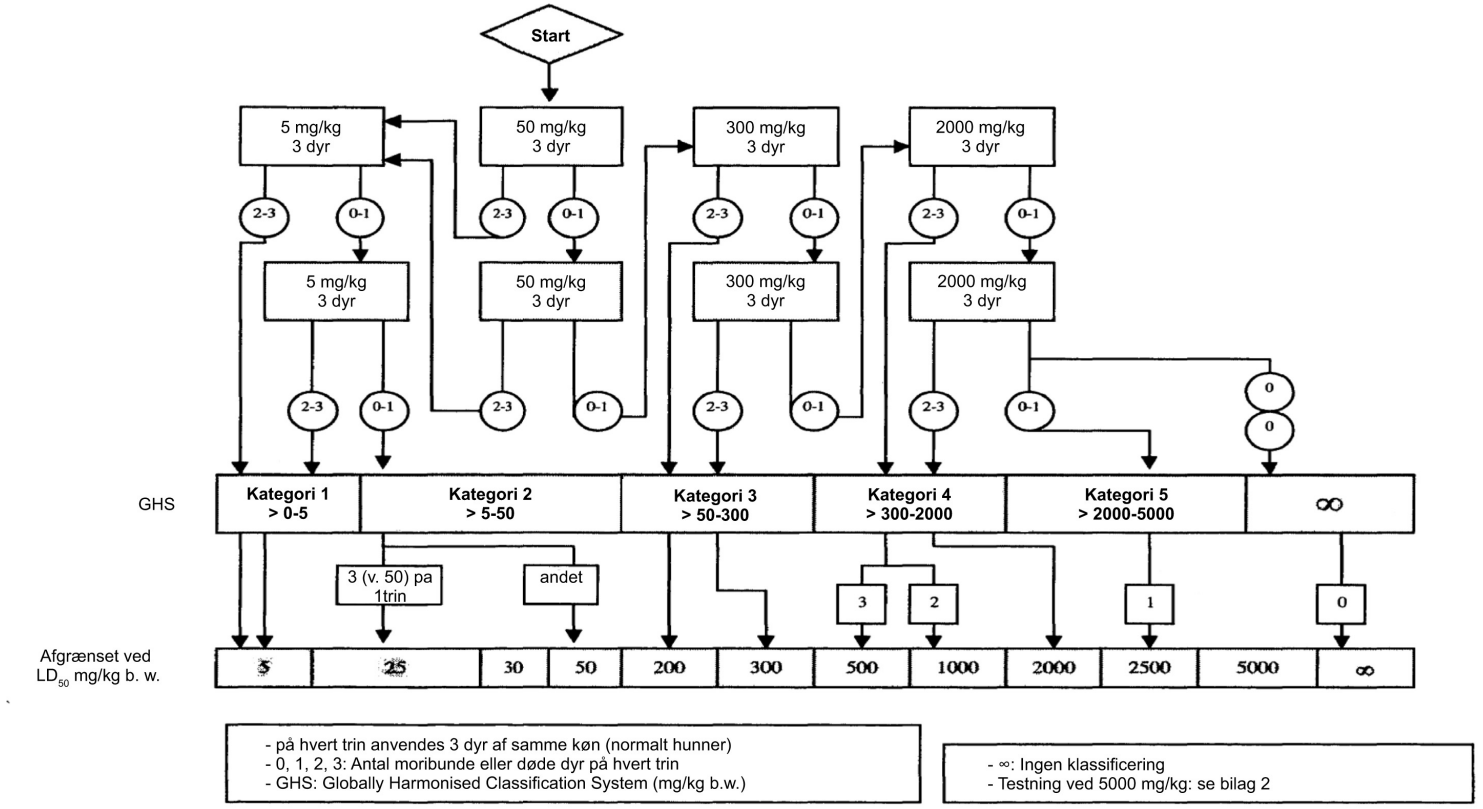
BILAG I A

FREMGANGSMÅDE VED ANVENDELSE AF EN STARTDOSIS PÅ 5 MG/KG KROPSV ÆGT



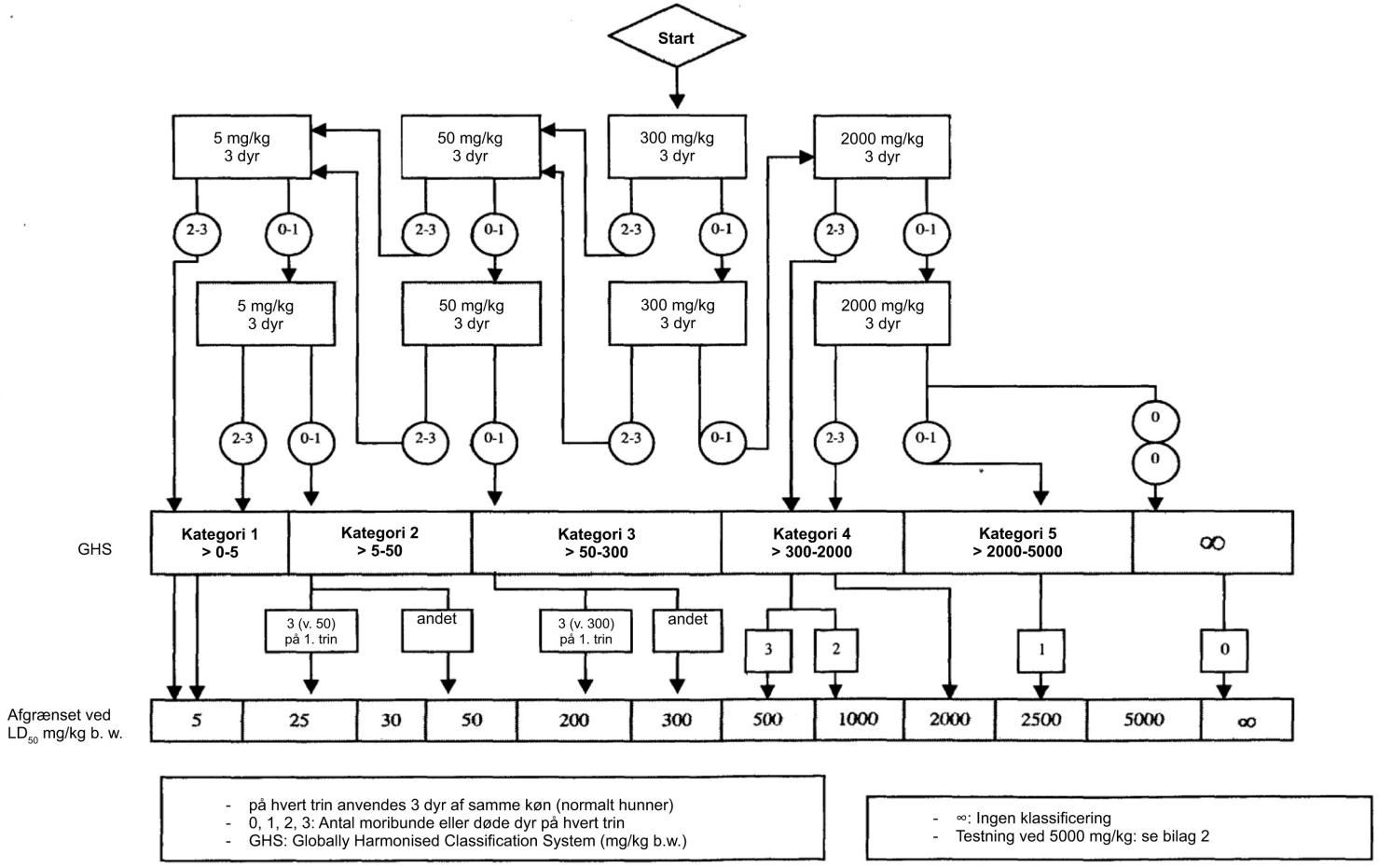
BILAG 1 B

FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 50 MG/KG KROPSVÆGT



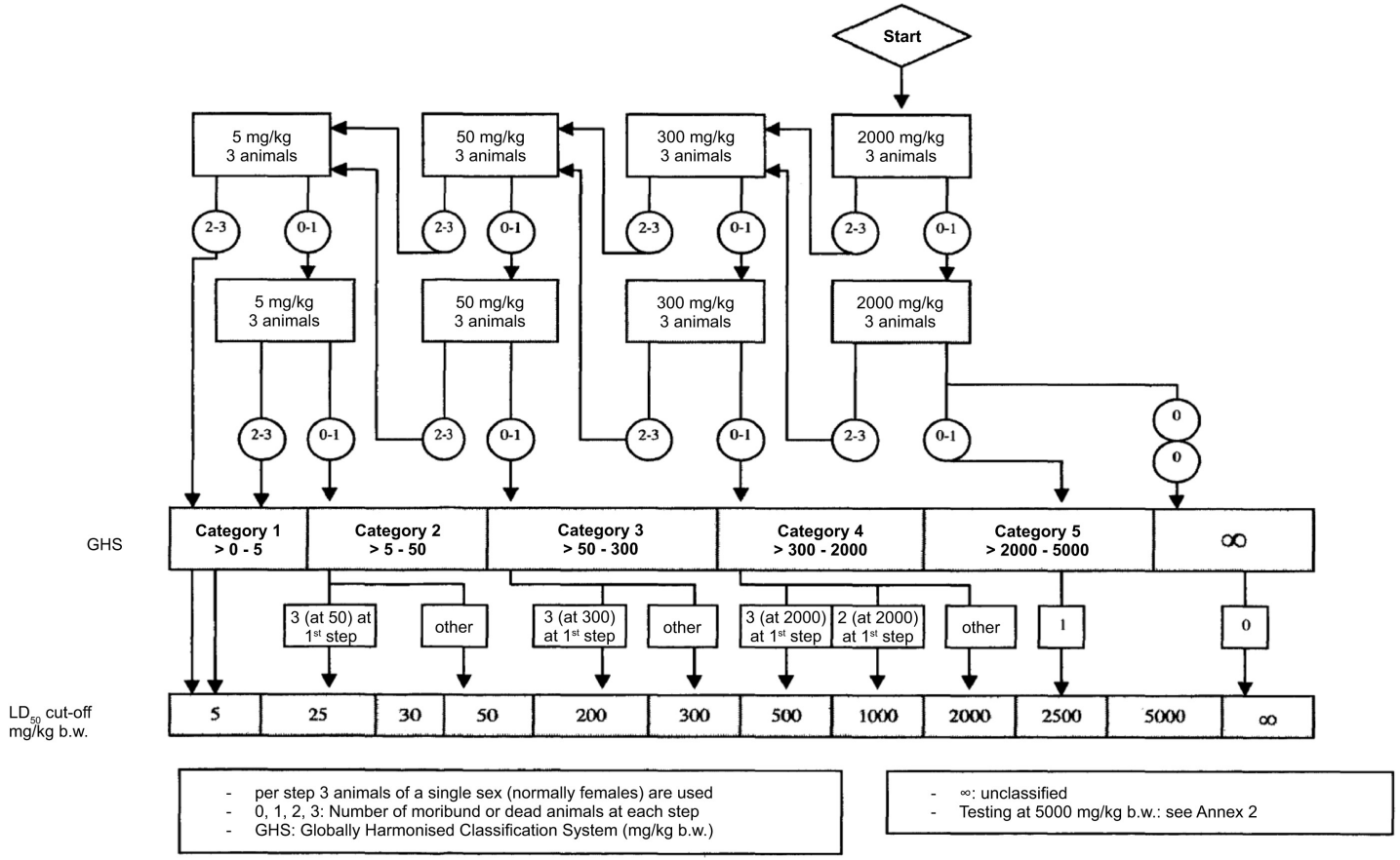
BILAG 1 C

FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 300 MG/KG KROPSVÆGT



BILAG 1 D

FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 2 000 MG/KG KROPSVÆGT



▼B

BILAG 2

KRITERIER FOR KLASSIFICERING AF TESTSTOFFER MED FORVENTET LD_{50} OVER 2 000 MG/KG UDENAT TESTNING ER NØDVENDIG

Kriterierne for farekategori 5 skal gøre det muligt at udpege teststoffer, som udviser relativ lav risiko for akut giftighed, men som under visse omstændigheder kan udgøre en fare for følsomme populationer. For disse stoffer forventes en oral eller dermal LD_{50} i området 2 000-5 000 mg/kg, eller tilsvarende doser for andre administrationsveje. i følgende tilfælde skal et teststof klassificeres i farekategorien defineret ved: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategori 5 i GHS):

a) Hvis de hører hjemme i denne kategori i henhold til enhver af testskemaerne i bilag l A-l D på grundlag af dødsfrekvensen

b) hvis foreliggende pålidelige oplysninger viser, at LD_{50} ligger i området svarende til kategori 5, eller hvis andredyreundersøgelser eller toksiske virkninger i mennesker viser, at der er grund til alvorlige sundhedsmæssige betænkeligheder

c) ved ekstrapolation, skønsmæssig ansættelse eller måling af data. når der ikke er grundlag for at tilordne stoffet til en farligere klasse, og

   — foreliggende pålidelige oplysninger viser betydelig toksisk virkning på mennesker, eller

   — der iagttages dødelighed ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 ved oral indgift, eller

   — ekspertvurderinger bekræfter, at der ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 findes væsentlige kliniske tegn på toksicitet, bortset fra diarré, pilorektion eller uplejet udseende af pels. eller

   — ekspertvurderinger bekræfter pålidelige oplysninger om potentiale for væsentlige akutte virkninger i de andre dyreforsøg.

TESTNING VED DOSER OVER 2 000 MG/KG

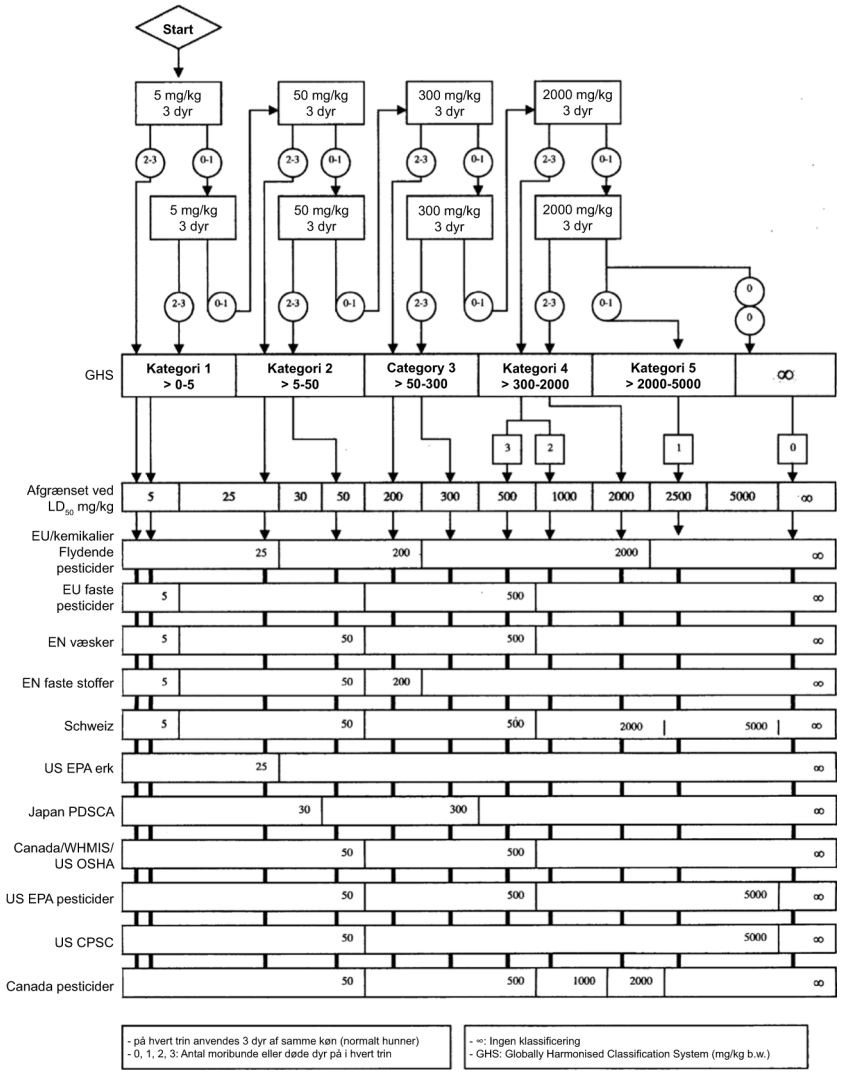
Dyrevelfærdsmæssige hensyn taler imod testning i området 5 000 mg/kg i kategori 5 (5 000 mg/kg), og et sådant forsøg bør kun overvejes, når dets resultater med overvejende sandsynlighed må forventes at få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed eller miljøet (10). Der bør ikke udføres yderligere forsøg ved højere dosisniveauer.

Er testning ved 5 000 mg/kg nødvendig, kræves kun ét trin (dvs. tre dyr). Hvis det først doserede dyr dør, fortsættes testningen ved 2 000 mg/kg efter skemaerne i bilag 1. Overlever det første dyr, doseres to dyr mere. Hvis kun ét af de tre dyr dør, er den forventede LD_{50}-værdi over 5 000 mg/kg. Hvis begge dyr dør, fortsætter doseringen ved 2 000 mg/kg.

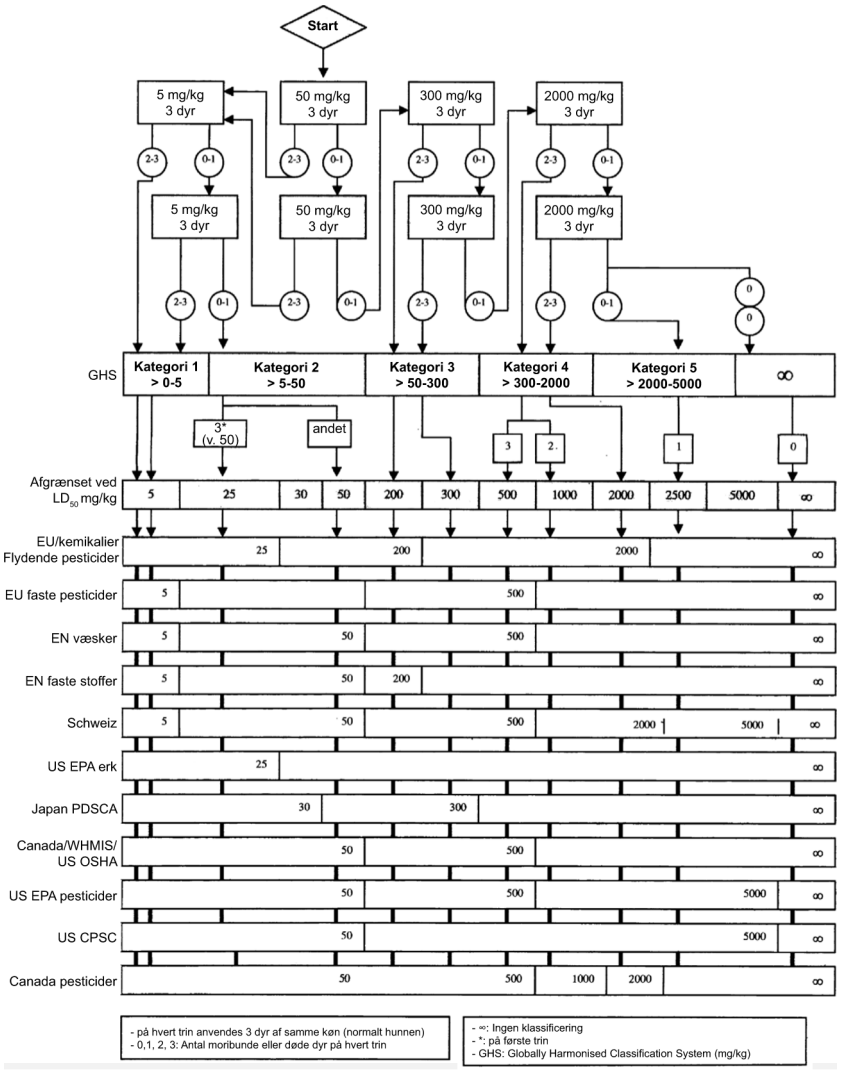
▼B

BILAG 3

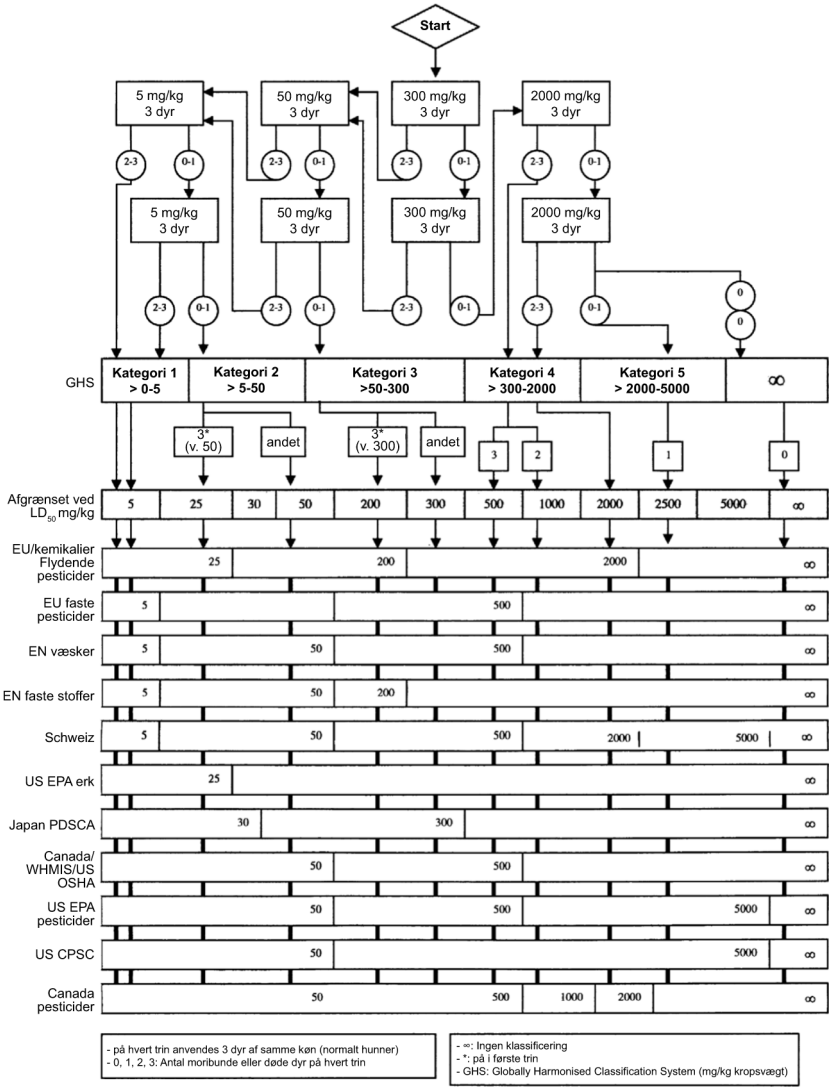
TESTMETODE B.1 b. Vejledning i klassificering efter EU-systemet i overgangsperioden indtil fuld gennemførelse af det globale harmoniserede klassifikationssystem (GHS) (fra henvisning (8))



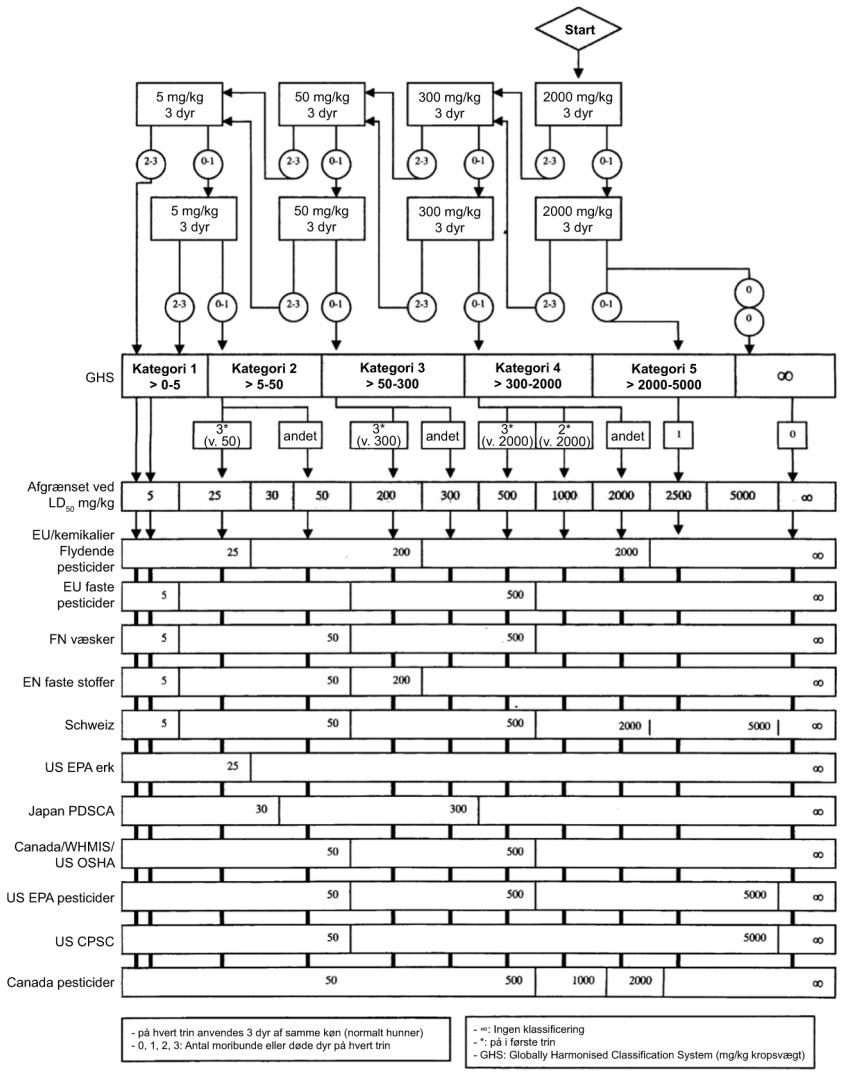
▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 > 50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
Afgrænset ved LD50 mg/kg
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/kemikalier Flydende pesticider
EU faste pesticider
EN væsker
EN faste stoffer
Schweiz
US EPA erk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticider
US CPSC
Canada pesticider
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunnen)
- 0,1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- ∞: Ingen klassificering
- *: på første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 >50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
3* (v. 300)
Afgrænset ved LD50 mg/kg
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/kemikalier Flydende pesticider
EU faste pesticider
EN væsker
EN faste stoffer
Schweiz
US EPA erk
Japan PDSCA
Canada/ WHMIS/US OSHA
US EPA pesticider
US CPSC
Canada pesticider
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunner)
- 0, 1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- ∞: Ingen klassificering
- *: på i første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg kropsvægt)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 > 50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
3* (v. 300)
3* (v. 2000)
2* (v. 2000)
1
Afgrænset ved LD_{50} mg/kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalier Flydende pesticider
EU faste pesticider
FN væsker
EN faste stoffer
Schweiz
US EPA erk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticider
US CPSC
Canada pesticider
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunner)
- 0, 1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- ∞: Ingen klassificering
- *: på i første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg kropsvægt)

▼M4

B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 403 (2009) (1). Den oprindelige Test Guideline 403 (TG 403) for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981. Formålet med denne reviderede testmetode B.2 (som svarer til den reviderede TG 403) er at sikre mere fleksibilitet, reducere omfanget af dyreforsøg og opfylde myndighedsbestemmelser. Den reviderede testmetode omfatter to typer forsøg: en traditionel LC_{50}-protokol og en koncentration × tid-protokol (C × t). Denne testmetode er primært kendetegnet ved dens evne til at tilvejebringe en koncentrationsresponsrelation varierede fra ikke-dødelige til dødelige resultater med henblik på at få en gennemsnitlig dødelig dosis (LC_{50}), ikke-dødelig tærskelkoncentration (f.eks. LC_{01}) og hældning og dens evne til at identificere mulig kønsspecifik modtagelighed. C × t-protokollen bør anvendes, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab [f.eks. udledning af værdier for Acute Exposure Guideline Levels (AEGL), Emergency Response Planning Guidelines (ERPG) eller Acute Exposure Threshold Levels (AETL)] eller med henblik på fysisk planlægning.

2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39) (2).

3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i GD 39 (2).

4. Denne testmetode muliggør karakterisering og kvantitativ risikovurdering af testkemikaliet og gør det muligt at vurdere og klassificere testkemikalierne i overensstemmelse med forordning (EF) nr. 1272/2008 (3). GD 39 (2) beskriver, hvordan den mest hensigtsmæssige metode til akut testning vælges. Hvis der kun kræves oplysninger om klassificering og mærkning, anbefales generelt kapitel B.52 i dette bilag (4) [se GD 39 (2)]. Denne testmetode B.2 er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet, herunder eksisterende forsøg (f.eks. kapitel B.52 i dette bilag (4)), hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer [se GD 39 (2)].

▼M4

6. Test af ætsende og/eller irriterende testkemikalier ved koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, bør så vidt muligt undgås. Ætsnings-/irritationsstyrken skal evalueres af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr (f.eks. fra forsøg med gentagen dosering udført ved koncentrationer, der ikke er ætsende/irriterende), eksisterende in vitro-data [f.eks. fra kapitel B.40 (5) og kapitel B.40.A (6) i dette bilag eller OECD TG 435 (7)], pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data med henblik på at undersøge, om yderligere test kan undgås. Når konkrete myndighedsbestemmelser gør det nødvendigt (f.eks. i forbindelse med planlægning af nødberedskab), kan denne testmetode bruges til eksponering af dyr for sådanne materialer, fordi det giver forsøgslederen eller den primære investigator mulighed for at vælge målkoncentrationerne. Målkoncentrationerne bør dog ikke have svære irriterende/ætsende virkninger, men alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i hvert enkelt tilfælde, og den valgte koncentration bør begrundes [se GD 39 (2)].

TESTENS PRINCIP

7. Denne reviderede testmetode B.2 har til formål at tilvejebringe tilstrækkelige oplysninger om den akutte toksicitet af et testkemikalie til, at det kan klassificeres, og til at tilvejebringe data om dødelighed (f.eks. LC_{50}, LC_{01} og hældning) for et eller begge køn, hvis det er nødvendigt til de kvantitative risikovurderinger. Denne testmetode omfatter to metoder. Den første metode er en traditionel protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekoncentration (grænsetest) eller en serie af koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde i en forudbestemt periode på normalt fire timer. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. Den anden metode er en C × t-protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekoncentration eller en serie af flere koncentrationer i flere perioder.

8. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humant og betragtes ved fortolkningen af testresultatet på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (8).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

9. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

Forberedelse af dyrene

10. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnes også testudstyret i en kort perioden inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

▼M4

Dyreopdræt og -sundhed

11. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

12. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med forsøget kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i forsøgsrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

13. Eksponering gennem næsen kan være af enhver varighed på op til seks timer for rotter. Hvis mus eksponeres gennem næsen, må eksponeringstiden generelt ikke overstige fire timer. Der gives en begrundelse, hvis test af længere varighed er påkrævet [se GD 39 (2)]. Dyr, der eksponeres for aerosoler i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliet som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

14. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

▼M4

Partikelstørrelsesfordeling

15. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 μm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (2) (9) (10). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroskopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

16. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliet ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliets sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliet skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable stoffer, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

Kontroldyr

17. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

18. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (2) (11). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

▼M4

Kammerets temperatur og relative fugtighed

19. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

20. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

21. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før forsøget. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.

22. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

23. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør

▼M4

der anvendes fire prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå t_{95}. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).

24. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

25. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 15).

FREMGANGSMÅDE

26. To forsøgstyper er beskrevet nedenfor: en traditionel protokol og en C × t-protokol. Begge protokoller kan omfatte et forforsøg, et hovedforsøg og/eller en grænsetest (traditionel protokol) eller testning ved en grænsekoncentration (C × t). Hvis et køn vides at være mere modtagelig, kan forsøgslederen vælge at udføre disse forsøg alene ved hjælp af det mest modtagelige køn. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Inden forsøget påbegyndes, undersøges alle tilgængelige data med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Data, der er indhentet ved hjælp af kapitel B.52 i dette bilag 4, kan f.eks. overflødiggøre behovet for et forforsøg og kan også vise, om et køn er mere modtageligt [se GD 39 (2)].

▼M4

TRADITIONEL PROTOKOL

Generelle betragtninger: Traditionel protokol

27. I et traditionelt forsøg eksponeres grupper af dyr for et testkemikalie i en bestemt tidsperiode (oftest 4 timer) i et kammer til eksponering gennem næsen eller helkropseksponering. Dyr eksponeres for en grænsekoncentration (grænsetest) eller mindst tre koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde (hovedforsøg). Et forforsøg kan udføres inden hovedforsøget, medmindre der allerede foreligger visse informationer om testkemikaliet, f.eks. et tidligere udført B.52-forsøg [se GD 39 (2)].

Forforsøg: traditionel protokol

28. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliets styrke, identificere kønsbetingede forskelle i modtagelighed og hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget eller grænsetesten. Når koncentrationerne vælges til forforsøget, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder tilgængelige (Q)SAR-data og data vedrørende lignende kemikalier. Højst tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hver koncentration (3 dyr/køn kan være nødvendigt for at fastslå en kønsbetinget forskel). Et forforsøg kan omfatte én koncentration, men flere koncentrationer kan om nødvendigt testes. Et forforsøg bør ikke teste så mange dyr og koncentrationer, at det ligner et hovedforsøg. Et tidligere udført B.52-forsøg (4) kan bruges i stedet for et forforsøg [se GD 39 (2)].

Grænsetest: traditionel protokol

29. En grænsetest bruges, når testkemikaliet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekoncentration. I en grænsetest eksponeres en gruppe af tre hanner og tre hunner for testkemikaliet ved en grænsekoncentration. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede kemikalier, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikaliets toksicitet, eller når testkemikaliet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres.

30. Valget af grænsekoncentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (MMAD på 1-4 μm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Grænsekoncentrationen bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

▼M4

31. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved grænsekoncentrationen, kan resultaterne af grænsetesten bruges som et forforsøg med henblik på yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekoncentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekoncentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikaliet muligvis genereres som en flydende aerosol.

Hovedforsøg: traditionel protokol

32. Et hovedforsøg udføres typisk med fem hanner og fem hunner (eller 5 dyr af det mest modtagelige køn, hvis det kendes) pr. koncentrationsniveau med mindst tre koncentrationsniveauer. Der skal bruges tilstrækkelige koncentrationsniveauer til at opnå en robust statistisk analyse. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Som følge af afhængigheden af avancerede teknologier er dette ikke altid praktisk muligt i inhalationsforsøg, og derfor bør eksponeringen af dyr ved det næste koncentrationsniveau baseres på tidligere erfaring og videnskabelig vurdering. GD 39 (2) bør anvendes ved test af blandinger.

KONCENTRATION × TID-PROTOKOL (C × T)

Generelle betragtninger: C × t-protokol

33. Et trinvist C × t-forsøg kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Denne fremgangsmåde gør det muligt at eksponere dyr for et testkemikalie ved flere koncentrationsniveauer og i flere tidsrum. Alle test udføres i et kammer til eksponering gennem næsen (helkropskamre er ikke anvendelige i forbindelse med denne protokol). Et flowdiagram i tillæg 1 illustrerer denne protokol. En simuleringsanalyse har vist, at den traditionelle protokol og C × t-protokollen begge kan give robuste LC_{50}-værdier, men C × t-protokollen er generelt bedre til at give robuste LC_{01}- og LC_{10}-værdier (15).

34. En simuleringsanalyse har vist, at det generelt er tilstrækkeligt at anvende to dyr pr. C × t-interval (et pr. køn ved brug af begge køn eller to af det mest modtagelige køn), når der testes fire koncentrationer og fem eksponeringsvarigheder i et hovedforsøg. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. C × t-interval (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration og tidspunkt, kan det reducere bias og variabiliteten af estimaterne, øge succesraten for estimeringen og forbedre konfidensintervallet. I tilfælde af utilstrækkelig tilpasning til de data, der er brugt til estimeringen (ved brug af et dyr pr. køn eller to dyr af det mest modtagelige køn), kan en femte eksponeringskoncentration også være tilstrækkelig. Yderligere vejledning om det antal dyr og koncentrationer, der skal anvendes i et C × t-forsøg, findes i GD 39 (2).

▼M4

Forforsøg: C × t-protokol

35. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliets styrke og til at hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget. Det kan være nødvendigt at udføre et forforsøg med op til tre dyr/køn/koncentration [se Appendix III i GD 39 (2)] for at vælge en hensigtsmæssig startkoncentration til hovedforsøget og minimere antallet af anvendte dyr. Der skal muligvis bruges tre dyr pr. køn for at fastslå en kønsbetinget forskel. Disse dyr bør eksponeres over én varighed, normalt 240 minutter. Muligheden for at skabe tilstrækkelige testatmosfærer bør vurderes i løbet af de tekniske forudgående test uden dyr. Det er generelt ikke nødvendigt at udføre et forforsøg, hvis mortalitetsdata er tilgængelige fra et B.52-forsøg (4). Når den indledende målkoncentration vælges i et B.2-forsøg, bør forsøgslederen overveje de mortalitetsmønstre, der er observeret i evt. tilgængelige B.52-forsøg (4) for begge køn og alle testede koncentrationer [se GD 39 (2)].

Startkoncentration: C × t-protokol

36. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1) er enten en grænsekoncentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Grupper af ét dyr/køn eksponeres for denne koncentration i flere tidsrum (f.eks. 15, 30, 60, 120 eller 240 minutter), så i alt 10 dyr eksponeres (kaldes eksponeringssession I) (tillæg 1).

37. Valget af grænsekoncentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør målet være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. en MMAD på 1-4 μm) ved en grænsekoncentration på 2 mg/l. Dette er muligt for de fleste testkemikalier. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Test, der overstiger en grænsekoncentration, bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden test ved startkoncentrationen, så det sikres, at betingelserne i kammeret for denne koncentration kan opnås.

38. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved startkoncentrationen, kan resultaterne ved denne koncentration bruges som udgangspunkt for yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekoncentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekoncentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikaliet muligvis genereres som en flydende aerosol.

▼M4

Hovedforsøg: C × t-protokol

39. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1), som testes i hovedforsøget, er enten en grænsekoncentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Hvis mortalitet er blevet observeret under eller efter eksponeringssession I, bruges den minimumseksponering (C × t), der resulterer i mortalitet, som rettesnor ved bestemmelsen af koncentrationen og eksponeringsperioderne til eksponeringssession II. Hver efterfølgende eksponeringssession afhænger af den forudgående session (se tillæg 1).

40. For mange testkemikalier er de resultater, der fås ved startkoncentrationen kombineret med tre yderligere eksponeringssessioner med et mindre tidsinterval (dvs. den geometriske afstand mellem eksponeringsperioder som angivet af faktoren mellem successive perioder, generelt $\sqrt{2}$), tilstrækkelige til at bestemme C × t-mortalitetsforholdet (15), men det kan være en fordel af bruge en femte eksponeringskoncentration [se tillæg 1 og GD 39 (2)]. Oplysninger om den matematiske behandling af resultater til C × t-protokollen findes i tillæg 1.

OBSERVATIONER

41. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionsperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant af hensyn til dyrevelfærden. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikaliet, som kræver tidlig aflivning af dyrene. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Guidance Document on Humane Endpoints (GD 19), skal tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

42. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

Kropsvægt

43. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på ≥ 20 % sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humant ved afslutningen af perioden efter eksponering.

▼M4

Patologi

44. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

45. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan også omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

Testrapport

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

▼M4

Testkemikalie

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

— beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

▼M4

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m^3 osv.); volumenenheder (f.eks. ppm, ppb osv.) kan også rapporteres i parentes

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres

Testbetingelser

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliets sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliets sammensætning

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

— kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— estimater af letalitet (f.eks. LC_{50} eller LD_{01}) herunder 95 % konfidensgrænser, og hældning (hvis omfattet af evalueringsmetoden)

— statistisk relation, herunder estimat af eksponenten n (C × t-protokol); navnet på den anvendte statistiske software anføres.

▼M4

Diskussion og fortolkning af resultater

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (8).

— Hvis test i henhold til kapitel B.52 i dette bilag (4) blev afbrudt til fordel for denne testmetode B.2, gives en begrundelse.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

LITTERATUR:

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

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

(3) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

(4) Kapitel B.52 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetoden (ATC).

(5) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).

(6) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.

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

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

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

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

▼**M4**

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

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

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

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

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

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

DEFINITION

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

Tillæg 1

C × t-protokol

1. Et trinvist koncentration × tid-forsøg (C × t) kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Det udføres fortrinsvis, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab eller med henblik på fysisk planlægning. Metoden indledes normalt med test af en grænsekoncentration (eksponeringssession I), hvor dyrene eksponeres for et testkemikalie i fem perioder (f.eks. 15, 30, 60, 120 og 240 minutter), så der opnås flere varigheder inden for én eksponeringssession (se figur 1). Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. Disse koncentrationer må kun overskrides, hvis myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør test ved disse koncentrationer (se afsnit 37 i kapitel B.2).

2. Hvis der foreligger begrænsede eller ingen oplysninger om toksiciteten af testkemikalie, bør der udføres et forforsøg, hvor grupper på højst tre dyr pr. køn eksponeres for de målkoncentrationer, som forsøgslederen har valgt, generelt i 240 minutter.

3. Hvis en grænsekoncentration testes i løbet af eksponeringssession I, og der observeres mindre end 50 % mortalitet, kræves der ikke yderligere testning. Hvis forholdet mellem koncentration/tid/respons skal bestemmes på højere niveauer end den angivne grænsekoncentration på grund af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov, bør den næste eksponering ske ved et højere niveau, f.eks. to gange grænsekoncentrationen (dvs. 2 L i figur 1).

4. Hvis toksicitet observeres ved grænsekoncentrationen, skal der foretages yderligere testning (hovedforsøg). Disse yderligere eksponeringer gennemføres ved lavere koncentrationer (i figur 1: Eksponeringssession II, III eller IV) eller ved højere koncentrationer i kortere tid (i figur 1: Eksponeringssession IV) i tidsrum, der er tilpasset og ikke så stor spredning.

5. Testen (startkoncentration og yderligere koncentrationer) gennemføres med ét dyr/køn pr. koncentration/tidspunkt eller med to dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. koncentration/tidspunkt (eller fire dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt) (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt, reduceres i de fleste tilfælde bias og variabiliteten af estimaterne, succesraten for estimeringen øges, og konfidensintervallet forbedres i forhold til protokollen som beskrevet her. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

6. Ideelt bør hver eksponeringssession gennemføres på én dag. Det gør det muligt at udsætte den næste eksponering, indtil der er rimelig sikkerhed for overlevelse, og det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Hver eksponeringssession bør indledes med den gruppe, der skal eksponeres i længst tid, f.eks. 240 minutter-eksponeringsgruppen efterfulgt af 120 minutter-eksponeringsgruppen osv. Hvis dyr i 240 minutter-gruppen f.eks. dør efter 90 minutter eller viser alvorlige tegn på toksicitet (f.eks. ekstreme forandringer i respirationsmønster, f.eks. besværet vejrtrækning), giver det ingen mening af eksponere en gruppe i 120 minutter, fordi mortaliteten sandsynligvis vil være 100 %. Forsøgslederen bør derfor vælge kortere eksponeringsvarigheder til den pågældende koncentration (f.eks. 90, 65, 45, 33 og 25 minutter).

▼M4

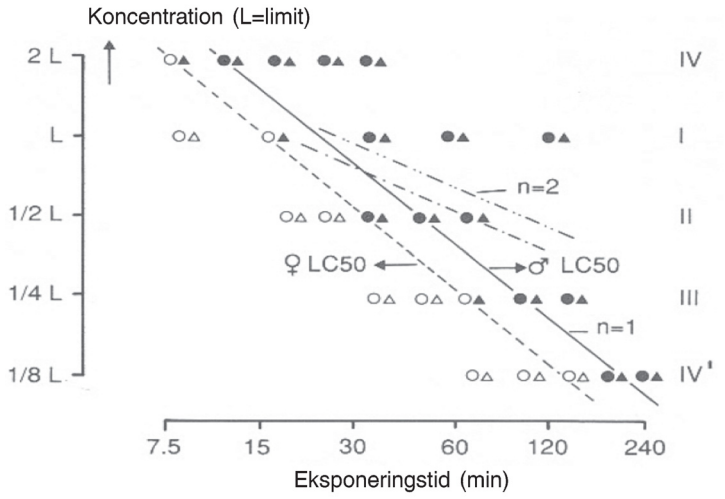
7. Koncentrationen i kammeret måles hyppigt for at bestemme den tidsvægtede gennemsnitskoncentration for hver eksponeringsvarighed. Dødstidspunktet for hvert dyr anvendes så vidt muligt i den statistiske analyse (i stedet for eksponeringsvarigheden).

8. Resultaterne af de første fire eksponeringssessioner undersøges med henblik på at identificere datamangler i koncentration-tidskurven (se figur 1). Ved utilstrækkelig tilpasning kan der gennemføres endnu en eksponering (femte koncentration). Koncentration og eksponeringsvarighed for den femte eksponering bør vælges, så denne mangel dækkes.

9. Alle eksponeringssessioner (herunder den første eksponeringssession) anvendes til at beregne forholdet mellem koncentration/tid/respons ved hjælp af statistisk analyse (16). Hvis det er muligt, anvendes den tidsvægtede gennemsnitskoncentration og eksponeringsvarigheden indtil død (hvis død indtræder i løbet af eksponeringen) for hvert C × t-interval.

Figur 1

Hypotetisk illustration af forholdet mellem koncentration/tid/mortalitet hos rotter



Åbne symboler = overlevende; udfyldte symboler = døde dyr

Trekanter = hunner; cirkler = hanner

Ubrudt linje = LC_{50}-værdier (interval 7,5-240 min.) for hanner med n = 1

Punkteret linje = LC_{50}-værdier (interval 7,5-240 min.) for hunner med n = 1

Stiplede linjer = hypotetiske LC_{50}-værdier for hanner og hunner, hvis n havde været lig med 2 (12).

Ordliste

Koncentration:

Eksponeringstid:

▼M4

10. Nedenfor findes et eksempel på en trinvis procedure:

Eksponeringssession I — Test ved grænsekoncentration (se figur 1)

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt ([a])

— Målkoncentration ([b]) = grænsekoncentration

— Fem grupper af dyr eksponeres ved denne målkoncentration i henholdsvis 15, 30, 60, 120 og 240 minutter

↓

Eksponeringssession II ([c]) — Hovedforsøg

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/2 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

↓

Eksponeringssession III — Hovedforsøg

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/4 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

↓

Eksponeringssession IV′ — Hovedforsøg

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/8 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

↓ eller

([a]) Hvis der ikke findes oplysninger om kønsbetinget modtagelighed, anvendes rotter af begge køn, *dvs.* et dyr/køn pr. koncentration. Ud fra de eksisterende informationer, eller hvis det i løbet af eksponeringen konstateres, at det ene køn er mere modtageligt, anvendes 10 dyr af det mest modtagelige køn (to dyr pr. koncentration/tidspunkt) ved hvert koncentrationsniveau i den efterfølgende test.

([b]) Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. I tilfælde af forventet toksicitet eller afhængigt af resultaterne af forforsøget vælges lavere startkoncentrationer. I tilfælde af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov kan der anvendes højere koncentrationer.

([c]) Ideelt udsættes eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe.

([d]) Den minimumsdosis (koncentration × tid), der resulterede i mortalitet under test med startkoncentrationen (første eksponeringssession) bruges som udgangspunkt ved fastlæggelsen af den næste kombination af koncentration og eksponeringsvarigheder. Koncentrationen reduceres typisk med det halve (1/2 L), og dyrene eksponeres i en ny tidsperiode med et mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 (√2; se reference 11) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. I denne figur (figur 1) blev mortalitet i eksponeringssession I først observeret ved 15 minutter. Varighederne i session II er derfor centreret omkring 30 minutter og er 15, 21 30, 42 og 60 minutter. Efter de første to eksponeringer anbefales det, at dataene indsættes i en figur som vist ovenfor, og det bør kontrolleres, om forholdet mellem koncentration og tid har en vinkel på 45 grader (n = 1), eller om forholdet mellem koncentration-tid-respons er mindre stejlt (f.eks. n = 2) eller stejlere (n = 0,8). I sidstnævnte tilfælde anbefales det på det kraftigste, at de næste koncentrationer og varigheder tilpasses tilsvarende.

▼M4

Eksponeringssession IV — Hovedforsøg

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en højere koncentration ([e]) (2 L) i lidt kortere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

Matematisk behandling af resultater til C × t-protokollen

11. En C × t-fremgangsmåde med fire eller fem eksponeringskoncentrationer og fem varigheder giver henholdsvis 20 eller 25 datapunkter. Med disse datapunkter kan C × t-forholdet beregnes ved hjælp af statistisk analyse (16):

Ligning 1

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

hvor C = koncentration; t = eksponeringsvarighed, eller

Ligning 2

$$Response = f(C^n\ t)$$

hvor $n = b_1/b_2$.

Ved hjælp af ligning 1 kan LC_{50}-værdien beregnes for en given tidsperiode (f.eks. 4 timer, 1 time, 30 minutter eller en tidsperiode inden for de testede tidsperioder) ved hjælp af P = 5 (50 % respons). Bemærk, at Habers regel kun gælder, når n = 1. LC_{01} kan beregnes ved hjælp af P = 2,67.

([e]) I visse tilfælde kan det være nødvendigt at øge koncentrationen (2 L) i løbet af et nyt tidsinterval med et endnu mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 (√2) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. Minimumseksponeringsvarigheden bør overstige 5 minutter. Maksimumseksponeringsvarigheden bør ikke overstige 8 timer.

▼B

B.3. **AKUT TOKSICITET (DERMAL)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres huden på flere grupper af forsøgsdyr i graduerede doser, idet der anvendes en bestemt dosis til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, der dør under forsaget, obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde. Undersøgelse af stoffer på en måde, som på grund af deres ætsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke påkrævet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgsgrupper, inden forsøget sættes i gang. Ca. 24 timer før forsøget påbegyndes, klippes eller barberes dyrene på ryggen. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af legemets overflade skal gøres klar til påføring af teststoffet. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på hudens permeabilitet for teststoffet. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

▼B

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst fem dyr (af samme køn) til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Foreligger der oplysninger om, at et bestemt køn er væsentligt mere følsomt, benyttes der dyr af dette køn.

Bemærk: Ved anvendelse af højere dyr end gnavere til undersøgelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsættes. Doserne skal fastlægges med omhu, og man skal bestræbe sig på ikke at benytte højere doser end moderat toksiske doser. I sådanne undersøgelser bør indgift af dødelige doser af teststoffet undgås.

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal være valgt således, at der opnås en graduering af de toksiske virkninger og dødeligheden i testgrupperne. Der bør ved valg af dosis tages hensyn til eventuelle hudirriterende eller ætsende virkninger. Der skal være tilstrækkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af LD_{50}.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Der kan med en gruppe på fem dyr af hvert køn udføres en grænsetest med en dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt efter den ovenfor beskrevne procedure. Optræder der teststofrelaterede dødsfald, kan gennemførelse af en fuldstændig undersøgelse komme i betragtning.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder, og af restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hver sit bur. Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel i en eksponeringsperiode på 24 timer. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert på plads, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales.

▼B

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Der foretages systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene dagligt observeres, så det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, dvs. at dyr, der findes døde, obduceres eller nedkøles, og at svage eller døende dyr isoleres eller aflives.

Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i pels, behandlet hud, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet samt adfærdsmønsteret. Der bør foretages omhyggelig observation af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet skal noteres så præcist som muligt. De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets afslutning, obduceres. Alle makroskopisk-patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

Vurdering af toksiciteten hos det modsatte køn

Efter afslutning af undersøgelsen med det ene køn testes en gruppe på fem dyr af det modsatte køn, så det konstateres, om dyr af dette køn er væsentligt mere følsomme over for teststoffet. I enkelte tilfælde kan anvendelse af færre dyr være velbegrundet. Foreligger der tilstrækkelige oplysninger om, at dyr af det køn, der er testet, er væsentligt mere følsomme, er test med dyr af det modsatte køn ikke påkrævet.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Dyrenes individuelle vægt bestemmes og registreres, kort før teststoffet påføres, derefter ugentligt og endelig på dødstidspunktet. Vægtændringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end én dag efter påføringen af teststoffet. Aflivning af dyr på human måde på grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede dødsfald. LD_{50} bestemmes efter en anerkendt metode.

Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis en sådan findes, mellem dyrenes eksponering for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk-patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

▼B

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser (herunder hvordan huden er renset og forbindingstypen; med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt, samt koncentration)

— forsøgsdyrenes køn

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosis (dvs, antal dyr, der er døde eller aflivet under forsøget; antal dyr, der har vist symptomer på toksicitet; antal eksponerede dyr)

— dødstidspunktet efter eksponeringen, begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr

— alle observationer

— LD_{50} for det køn, der har været genstand for en fuldstændig undersøgelse, bestemt efter 14. dag med angivelse af beregningsmetode

— 95 % konfidensinterval for LD_{50} (hvor det er muligt)

— dosis/dødelighedskurve og hældning, hvor beregningsmetoden muliggør det

— obduktionsfund

— eventuelle histopatologiske fund

— resultater af forsøg med det modsatte kan

— diskussion af resultaterne (med særlig opmærksomhed på, hvordan human aflivning af dyr under forsøget kan have indvirket på den beregnede LD_{50})

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B (punkt D).

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B (punkt E).

▼M8

B.4. AKUT HUDIRRITATION/-ÆTSNING

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 404 (2015). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier (Guidelines for Testing of Chemicals) revideres regelmæssigt for at sikre, at de afspejler den bedste tilgængelige viden. Ved revisionen af OECD TG 404 er der lagt særlig vægt på forbedringer i relation til betænkeligheder omkring dyrenes velfærd og vurdering af alle foreliggende oplysninger om testkemikaliet med henblik på at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr. Den opdaterede version af OECD TG 404 (der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) indeholder en henvisning til det vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) for hudirritation/-ætsning (1), som foreslår en modulær tilgang til testning for hudirritation og -ætsning. IATA beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og i) vejleder i, hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations-/hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (1). Når det er nødvendigt, anbefales det desuden i vejledningen, at man i den indledende in vivo-test anbringer de tre testlapper successivt i stedet for samtidigt på dyret.

2. Definitionerne af hudirritation og -ætsning findes i tillægget til denne forsøgsmetode.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-testning ikke udføres, før alle relevante data om testkemikaliets potentielle hudætsende eller hudirriterende egenskaber er vurderet ved en weight-of-the-evidence-analyse (WoE) som nævnt i det vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for hudætsning og -irritation, dvs. gennem det vejledende dokuments tre dele og deres tilsvarende moduler (1). Kort fortalt ses der i del 1 på eksisterende data gennem syv moduler, som omfatter data fra mennesker, in vivo-data, in vitro-data, data om fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. pH, navnlig kemikaliets stærkt sure eller basiske egenskaber) og ikke-forsøgsmetoder. I del 2 udføres WoE-analysen. Hvis denne WoE-analyse stadig er usikker, bør del 3 udføres med yderligere testning startende med in vitro-metoder, og in vivo-testning anvendes som en sidste udvej. Analysen bør derfor mindske behovet for in vivo-testning til bestemmelse af testkemikaliers hudætsende/-irriterende egenskaber, for hvilke der allerede foreligger tilstrækkelig dokumentation fra andre undersøgelser vedrørende disse to endepunkter.

IN VIVO-TESTENS PRINCIP

4. En enkelt dosis af testkemikaliet påføres på huden af et forsøgsdyr. De ubehandlede hudområder på dyret tjener som kontrol. Graden af irritation/ætsning bestemmes og klassificeres med de foreskrevne intervaller og beskrives yderligere med henblik på at give en fuldstændig evaluering af virkningerne. Undersøgelsen skal strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkningers reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.

▼M8

5. Dyr, som viser vedvarende tegn på stærk lidelse og/eller smerte i en hvilken som helst del af forsøget, aflives humant, og testkemikaliet vurderes tilsvarende. Kriterierne for beslutningen om human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i et separat vejledende dokument (2).

FORBEREDELSE AF IN VIVO-TESTEN

Valg af dyreart

6. Det foretrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge voksne dyr. Anvendes andre arter, skal dette valg begrundes.

Klargøring af dyrene

7. Ca. 24 timer før forsøget fjernes pelsen ved tæt klipning af dyrenes ryg. Der drages omsorg for ikke at beskadige huden, og kun dyr med sund, intakt hud må anvendes.

8. Visse kaninstammer har pletter med tæt hårvækst, som er mere eller mindre fremtrædende, afhængigt af årstiden. Sådanne områder med tæt hårvækst bør ikke anvendes som testområder.

Miljø og fodringsbetingelser

9. Dyrene bør holdes i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 20 °C (± 3 °C) for kaniner. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

TESTPROCEDURE

Påføring af testkemikaliet

10. Testkemikaliet påføres på et lille område (ca. 6 cm^2) af huden og dækkes med en gazelap, som holdes på plads med en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Hvis der anvendes testkemikalier i væskeform eller pastaform, kan det være nødvendigt at påføre testkemikaliet på gazelappen og derefter placere lappen på huden. I eksponeringsperioden bør testkemikaliet holdes i løs kontakt med huden ved hjælp af en passende semiokklusiv forbinding. Hvis testkemikaliet påføres på gazelappen, bør denne fastgøres til huden, således at der er god kontakt og ensartet fordeling af testkemikaliet på huden. Dyret må ikke have adgang til gazelappen og skal være forhindret i at kunne indtage eller inhalere testkemikaliet.

11. Testkemikalier i væskeform anvendes sædvanligvis ufortyndet. Ved testning af faste stoffer, som – hvis det er hensigtsmæssigt – kan pulveriseres, skal testkemikaliet fugtes tilstrækkeligt med den mindst mulige mængde vand eller om nødvendigt med et passende bærestof for at sikre god kontakt med huden. Anvendes andre bærestoffer end vand, må dette kun have minimal indflydelse på testkemikaliets hudirriterende virkning.

12. Ved slutningen af eksponeringsperioden, som normalt er 4 timer, fjernes tilbagesiddende testkemikalie så vidt muligt ved hjælp af vand eller et egnet opløsningsmiddel, idet det undgås at påvirke den fremkomne respons eller beskadige epidermis.

▼M8

Dosisniveau

13. Testarealet påføres 0,5 ml flydende eller 0,5 g fast eller halvflydende testkemikalie.

Indledende test (in vivo-test af hudirritation/-ætsning i ét dyr)

14. Når et testkemikalie er bedømt som ætsende, irriterende eller ikke-klassificeret på grundlag af en weight-of-the-evidence-analyse eller forudgående in vitro-testning, er der sædvanligvis ikke behov for yderligere in vivo-testning. I tilfælde, hvor der menes at være behov for yderligere data, udføres in vivo-testen først i ét dyr efter følgende fremgangsmåde: Der anbringes successivt op til tre testlapper på dyret. Den første lap fjernes efter tre minutter. Ses ingen alvorlig hudreaktion, anbringes en ny testlap på et andet område, som fjernes efter en time. Viser observationerne på dette trin, at eksponeringen humant kan udvides til 4 timer, anbringes en tredje lap, som fjernes efter 4 timer, hvorpå responsen vurderes.

15. Iagttages en ætsende virkning efter en af de tre successive eksponeringer, afsluttes testen straks. Iagttages ingen ætsende virkning, efter at den sidste lap er fjernet, observeres dyret i 14 dage, medmindre der udvikler sig ætsning på et tidligere tidspunkt.

16. I tilfælde, hvor testkemikaliet ikke forventes at frembringe ætsning, men kan være irriterende, anbringes en enkelt lap på ét dyr i 4 timer.

Verifikationstest (in vivo-hudirritationstest i flere dyr)

17. Er der ikke iagttaget ætsende virkning i den indledende test, skal den irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr, hver gang med én lap, i en eksponeringsperiode på 4 timer. Iagttages en irriterende virkning i den indledende test, kan verifikationstesten udføres sekventielt eller ved eksponering af yderligere to dyr samtidigt. Er den indledende test undtagelsesvis ikke udført, kan to eller tre dyr behandles med én enkelt lap, som fjernes efter 4 timer. Anvendes to dyr, som begge udviser samme respons, er yderligere testning unødvendig. I modsat fald testes også det tredje dyr. Er responsen usikker, kan det være nødvendigt at evaluere resultaterne ved brug af flere dyr.

Observationsperiode

18. Observationsperioden bør strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkningers reversibilitet kan vurderes fuldt ud. Forsøget skal imidlertid afsluttes, når som helst dyrene viser vedvarende tegn på stærk smerte eller lidelse. For at bestemme virkningernes reversibilitet skal dyrene observeres i indtil 14 dage efter lappernes fjernelse. Observeres der reversibilitet inden for 14 dage, afsluttes forsøget på dette tidspunkt.

Kliniske observationer og klassificering af hudreaktioner

19. Alle dyr undersøges for tegn på erythem og ødem, og responsen tildeles score-værdi ved 60 minutter og derefter ved 24, 48 og 72 timer efter lappernes fjernelse. I den indledende test i ét dyr undersøges testområdet desuden straks efter lappernes fjernelse. Hudreaktioner klassificeres og registreres efter klassificeringen i nedenstående tabel. Er der hudskade, som ikke kan identificeres som irritation eller ætsning ved 72 timer, kan det være nødvendigt at fortsætte observationen indtil dag 14 for at fastslå virkningernes reversibilitet. Foruden observationen for irritation skal alle lokale

▼M8

toksiske virkninger, såsom tab af hudens fedtindhold, og alle systemiske bivirkninger (f.eks. kliniske symptomer på toksicitet samt kropsvægt) beskrives fuldstændigt og registreres. Til afklaring af en usikker respons bør histopatologisk undersøgelse indgå i vurderingen.

20. Klassificering af hudrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af hudresponsen og for at bistå testlaboratorierne og dem, som foretager og fortolker observationerne, skal observationerne foretages af personer, som er tilstrækkeligt fortrolige med det anvendte score-system (se nedenstående tabel). Det kan være nyttigt at anvende en illustreret vejledning i klassificering af hudirritation og andre læsioner (3).

DATA OG RAPPORTERING

21. Undersøgelsens resultater, som sammenfattes i tabelform i den endelige testrapport, skal dække alle de punkter, der er oplistet i punkt 24.

Vurdering af resultater

22. Score-værdierne for hudirritation vurderes sammen med læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet. De enkelte score-værdier repræsenterer ikke en absolut standard for et kemikalies irritationsfremkaldende egenskaber, da andre virkninger af testkemikaliet ligeledes vurderes. I stedet må de enkelte score-værdier betragtes som referenceværdier, som skal evalueres sammen med alle undersøgelsens øvrige observationer.

23. Hudlæsionernes reversibilitet skal tages i betragtning ved evaluering af irritationsrespons. Hvis respons som alopeci (af et begrænset område), hyperkeratose, hyperplasi og skældannelse varer ved frem til afslutningen af den 14-dages observationsperiode, anses testkemikaliet for at være irriterende.

Testrapport

24. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Begrundelse for in vivo-testning:

— Weight-of-the-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle teststrategi

— beskrivelse af relevante data fra tidligere forsøg

— data fra de enkelte trin i teststrategien

— beskrivelse af udførte in vitro-test med detaljeret beskrivelse af de anvendte procedurer og resultater opnået med test- og referencestof

— weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-undersøgelse.

Testkemikalie:

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

▼**M8**

— Stof med flere bestanddele, blandinger og stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB): så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— oprindelse, evt. batchnummer

— behandling af testkemikaliet/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt

— opbevaringsforhold.

Bærestof:

— identifikation, koncentration (hvis relevant), anvendt mængde

— begrundelse for valg af bærestof.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme, begrundelse for anvendelse af andre dyr end albinokaniner

— antal dyr af hvert køn

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og afslutning

— alder ved undersøgelsens begyndelse

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, foder osv.

Testbetingelser:

— metode til forberedelse af det sted, hvor lappen skal anbringes

— oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper

— oplysninger om testkemikaliets forberedelse, påføring og fjernelse.

Resultater:

— opstilling i tabelform af score-værdier for irritation/ætsning for hvert dyr på alle måletidspunkter

— beskrivelse af alle iagttagne læsioner

— forklarende beskrivelse af art og grad af den iagttagne irritation eller ætsning samt eventuelle histopatologiske fund

— beskrivelse af andre skadelige lokale (f.eks. tab af hudens fedtindhold) og systemiske virkninger foruden hudirritation eller -ætsning.

▼**M8**

Diskussion af resultater

Konklusioner

LITTERATUR

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tabel

Klassificering Af Hudreaktioner

Erythem og escharadannelse

Intet erythem…	0
Meget let erythem (knapt synligt)…	1
Veldefineret erythem…	2
Moderat til svært erythem…	3
Svært erythem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erythemet ……	4

Maksimumsværdi: 4

Ødemdannelse

Intet ødem…	0
Meget let ødem (knapt synligt)…	1
Let ødem (tydeligt afgrænset hævet område)…	2
Moderat ødem (hævet ca. 1 mm)…	3
Svært ødem (hævet mere end 1 mm og udstrækning ud over det eksponerede område)…	4

Maksimumsværdi: 4

Til afklaring af en usikker respons kan histopatologisk undersøgelse indgå i vurderingen.

▼**M8**

Tillæg

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Hudirritation: fremkaldelse af reversibel skade på huden ved påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer.

Hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning og blodige skorper og efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

▼M7

B.5. **AKUT ØJENIRRITATION/-ÆTSNING**

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 405 (2012). OECD-testvejledningen om test af kemikalier (Test Guidelines for Testing of Chemicals) revideres regelmæssigt for at sikre, at de afspejler den bedste tilgængelige viden. I tidligere revisioner af denne testvejledning er der lagt særlig vægt på de forbedringer, som kan opnås ved at vurdere alle foreliggende oplysninger om testkemikaliet med henblik på at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr og dermed komme betænkeligheder omkring dyrenes velfærd i møde. I TG 405 (som blev vedtaget i 1981 og ajourført i 1987, 2002 og 2012) indgår en anbefaling om, at man før iværksættelse af den beskrevne in vivo-test for akut øjenirritation/-ætsning bør gennemføre en weight-of-the-evidence-analyse (1) af foreliggende relevante data. Er de foreliggende data utilstrækkelige, anbefales det at udbygge dem ved sekventiel test (2) (3). Den anbefalede teststrategi, som omfatter validerede og anerkendte in vitro-test, er givet som supplement til denne forsøgsmetode. Med henblik på anvendelsen af forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) ([1]) omfatter den relevante ECHA-vejledning desuden en integreret teststrategi (21). Dyreforsøg bør kun foretages, hvis det vurderes nødvendigt efter gennemgang af tilgængelige alternative metoder og brug af de metoder, der anses for at være hensigtsmæssige. På tidspunktet for udarbejdelsen af denne ajourførte forsøgsmetode er der tilfælde, hvor det fortsat er nødvendigt eller påkrævet at anvende denne forsøgsmetode i henhold til visse lovrammer.

Den seneste ajourføring fokuserede primært på brug af analgetika og anæstetika uden at påvirke det grundlæggende koncept og strukturen i testvejledningen. ICCVAM ([2]) og et uafhængigt internationalt peer review-panel evaluerede anvendeligheden af og begrænsningerne for rutinemæssig brug af lokalanæstetika, systemiske analgetika og humane endepunkter ved in vivo-sikkerhedsundersøgelser af øjenirritation (12). Konklusionen på revisionen lød, at man ved at anvende lokalanæstetika og systemiske analgetika kan undgå de fleste eller alle smerter og lidelser uden at påvirke resultatet af testen, og det blev anbefalet, at disse stoffer altid anvendes. Denne forsøgsmetode tager hensyn til denne revision. Lokalanæstetika, systemiske analgetika og humane endepunkter bør anvendes rutinemæssigt ved akut øjenirritation og -ætsning i in vivo-test. Eventuelle undtagelser fra at bruge dem bør begrundes. Med forbedringerne i denne metode vil dyrenes smerter og lidelser i høj grad blive reduceret eller helt undgået i de fleste testsituationer, hvor der fortsat er behov for in vivo-øjensikkerhedstest.

Afbalanceret forebyggende smertebehandling bør omfatte i) rutinemæssig forbehandling med et lokalt anæstetikum (f.eks. proparacain eller tetracain) og et systemisk analgetikum (f.eks. buprenorphin), ii) rutinemæssig efterbehandling af systemiske analgetika (f.eks. buprenorphin og meloxicam), iii), planlagt observation, overvågning og registrering af dyrene for kliniske tegn på smerte og/eller lidelse og iv) planlagt observation, overvågning og registrering af arten og omfanget af samt udviklingen i alle øjenskader. Yderligere oplysninger kan

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 304 af 22.11.2007, s. 1.

([2]) The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

▼M7

findes i den ajourførte fremgangsmåde, som er beskrevet i det følgende. Efter indgivelse af testkemikaliet bør der ikke anvendes yderligere lokalanæstetika eller analgetika for at undgå forstyrrelser af forsøget. Analgetika med anti-inflammatorisk aktivitet (f.eks. meloxicam) bør ikke anvendes lokalt, og de systemisk anvendte doser bør ikke forstyrre virkningen på øjet.

Definitioner findes i tillægget til forsøgsmetoden.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-test ikke udføres, før alle relevante data om kemikaliets potentielle øjenætsende eller -irriterende egenskaber er vurderet ved en weight-of-the-evidence-analyse. Sådanne data består af dokumentation fra foreliggende undersøgelser hos mennesker og/eller laboratoriedyr, dokumentation for øjenætsende/-irriterende virkning af et eller flere strukturelt beslægtede stoffer eller af blandinger af sådanne stoffer, data, som viser, at kemikaliet er stærkt surt eller basisk (4) (5), og resultater af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for hudætsning og øjenætsning/-irritation (6) (13) (14) (15) (16) (17). Undersøgelserne kan være blevet foretaget forud for eller som følge af en weight-of-the-evidence-analyse.

For visse kemikalier kan en sådan analyse vise, at der er behov for in vivo-undersøgelser af, om kemikaliet eventuelt er øjenætsende/-irriterende. I alle sådanne tilfælde bør der først, inden man overvejer en in vivo-øjentest, helst foretages en undersøgelse af kemikaliets hudætsende virkning i in vitro- og/eller in vivo-test med efterfølgende vurdering i overensstemmelse med den sekventielle teststrategi i forsøgsmetode B.4 (7) eller den integrerede teststrategi i ECHA-vejledningen (21).

Denne forsøgsmetode omfatter en supplerende sekventiel teststrategi, som omfatter validerede in vitro- eller ex vivo-test af øjenætsning/-irritation i forbindelse med REACH, i ECHA-vejledningen (21). Det anbefales, at en sådan teststrategi følges, inden der foretages in vivo-test. For nye kemikalier anbefales en trinvis teststrategi til at indhente videnskabeligt forsvarlige oplysninger om kemikaliets ætsende/irriterende virkning. For eksisterende kemikalier, som ikke er tilstrækkelig undersøgt for hud- og øjenætsning/-irritation, kan strategien anvendes til at supplere de mangelfulde data. Anvendes en anden teststrategi eller -metode, eller beslutter man sig for ikke at følge den trinvise teststrategi, bør dette begrundes.

IN VIVO-TESTENS PRINCIP

Efter forbehandling med et systemisk analgetikum og induktion af et passende lokal anæstetikum, påføres det kemikalie, der skal testes, i en enkelt dosis til forsøgsdyrets ene øje; det ubehandlede øje tjener som kontrol. Graden af øjenirritation/-ætsning vurderes ved tildeling af scoreværdier til læsionerne af conjunctiva, cornea og iris med bestemte intervaller. Andre virkninger på øjet og systemiske negative virkninger beskrives ligeledes, således at man har en fuldstændig bedømmelse af virkningerne. Undersøgelsen bør strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at virkningernes reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.

Dyr, der på noget tidspunkt under testen viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte eller læsioner, som svarer til de humane endepunkter, som er beskrevet i denne forsøgsmetode (jf. punkt 26), bør aflives humant, og kemikaliet bør vurderes tilsvarende. Kriterierne for at træffe beslutningen om human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i en OECD-vejledning (8).

▼M7

FORBEREDELSE TIL IN VIVO-TESTEN

Valg af art

Det foretrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge kønsmodne dyr. Anvendes andre arter, bør der fremlægges begrundelse herfor.

Forberedelse af dyr

På hvert af de foreløbigt udvalgte dyr bør begge øjne undersøges, højst 24 timer før testen begynder. Dyr, som udviser øjenirritation eller øjendefekter, eller som i forvejen har beskadiget cornea, bør ikke anvendes.

Miljø og fodringsbetingelser

Dyrene bør holdes i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 20 °C (± 3 °C) for kaniner. Den relative luftfugtighed bør være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Alt for høj lysintensitet bør undgås. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

TESTPROCEDURE

Brug af lokalanæstetika og systemiske analgetika

Det anbefales at følge nedenstående procedurer for at undgå eller minimere smerte og lidelse under testproceduren for øjensikkerhed. Alternative fremgangsmåder, som har vist sig at give lige så god eller bedre undgåelse eller lindring af smerte eller lidelse, kan anvendes.

— 60 minutter før det kemiske stof påføres, indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion for at opnå et terapeutisk niveau af systemiske analgetika. Buprenorphin og andre lignende opiode analgetika, der indgives systemisk, er ikke kendt for eller ventes ikke at ændre øjets respons (12).

— Fem minutter før det kemiske stof tilsættes, tilføres en eller to dråber af et lokalt anæstetikum til øjnene (f.eks. 0,5 % proparacainhydrochlorid eller 0,5 % tetracainhydrochlorid) i hvert øje. For at undgå mulige forstyrrelser i forbindelse med undersøgelsen anbefales det at anvende et lokalt anæstetikum, der ikke indeholder konserveringsmidler. Det øje på hvert dyr, der ikke behandles med testkemikaliet, men som behandles med lokalanæstetika, tjener som kontrol. Hvis testkemikaliet forventes at fremkalde betydelig smerte og lidelse, bør det normalt ikke testes in vivo. I tilfælde af tvivl, eller når test er nødvendigt, bør man være opmærksom på yderligere applikationer af lokalanæstetikum med 5-minutters intervaller, før det kemiske stof påføres. Brugerne bør være opmærksomme på, at flere applikationer af lokalanæstetika potentielt kan forårsage en mindre stigning i styrken af og/eller den tid, der kræves, før kemisk inducerede læsioner forsvinder.

— Otte timer efter det kemiske stof er påført, indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion og meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion for at sikre et fortsat terapeutisk niveau af systemiske analgetika. Selv om der ikke findes data, som tyder på, at meloxicam har anti-inflammatoriske virkninger i øjet, når det indgives ved subkutan injektion en gang dagligt, bør meloxicam ikke indgives før mindst otte timer efter, at det kemiske stof er påført, for at undgå forstyrrelser i undersøgelsen (12).

— Otte timer efter behandlingen med det kemiske stof bør der indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion hver 12. time, sammen med meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion hver 24. time, indtil øjenlæsionerne svinder, og der ikke længere er kliniske tegn på smerte og lidelse. Der

▼M7

findes analgetikumpræparater med langsom frigivelse, som kan overvejes for at reducere hyppigheden af analgetikumdosering.

— »Redningsanalgetika« bør gives, umiddelbart efter det kemiske stof er påført, hvis forebyggende analgetika og lokalanæstetika er utilstrækkelige. Hvis et dyr viser tegn på smerte og lidelse i løbet af undersøgelsen, gives straks en »redningsdosis« buprenorphin 0,03 mg/kg ved subkutan injektion, som gentages så ofte som hver 8. time, hvis det er nødvendigt, i stedet for 0,01 mg/kg ved subkutan injektion hver 12. time. Sammen med denne »redningsdosis« buprenorphin indgives meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion hver 24. time, men først mindst 8 timer efter det kemiske stof er påført.

Applikation af testkemikaliet

Testkemikaliet bør anbringes i conjunctivalsækken af det ene øje på hvert dyr, idet det nederste øjenlåg forsigtigt trækkes lidt ud fra øjeæblet. Derefter holdes øjenlågene sammen i ca. et sekund for at forhindre, at noget af materialet løber ud. Det ubehandlede øje fungerer som kontrol.

Skylning

I mindst 24 timer efter instillation af testkemikaliet bør der ikke foretages skylning af forsøgsdyrenes øjne, bortset fra faststof (jf. punkt 18) eller i tilfælde af øjeblikkeligt indsættende ætsende eller irriterende virkning. Efter 24 timer kan øjet skylles, hvis det anses for hensigtsmæssigt.

Anvendelse af en satellitgruppe af dyr til undersøgelse af virkningen af skylningen kan ikke anbefales, medmindre det er videnskabeligt begrundet. Er en satellitgruppe nødvendig, bør den bestå af to kaniner. Skylningsomstændighederne bør nøje dokumenteres, således skylningstidspunkt, skyllevæskens sammensætning og temperatur samt skylningens varighed, anvendt væskevolumen og -hastighed.

Dosisniveau

1) *Undersøgelse af væsker*

Ved undersøgelse af væsker anvendes 0,1 ml. Der bør ikke anvendes pumpespray til direkte instillation af kemikaliet i øjet. I stedet bør væsken sprøjtes ud af sprayflasken og opsamles i et kar, før der instilleres 0,1 ml i øjet.

2) *Undersøgelse af faste stoffer*

Ved undersøgelse af faste stoffer, pastaer og fintfordelte faste kemikalier bør der anvendes et volumen på 0,1 ml eller en vægtmængde på højst 100 mg. Testkemikaliet bør rives til finkornet støv. Partiklernes volumen bør måles efter let sammenpresning, f.eks. frembragt ved små slag på målekarret. Er det faste testkemikalie ikke forsvundet fra dyrets øje ad naturlig vej på det første observationstidspunkt en time efter behandlingen, kan øjet skylles med saltvand eller destilleret vand.

3) *Undersøgelse af aerosoler*

Det anbefales, at alle pumpesprayprodukter og aerosoler opsamles før instillation i øjet. Den eneste undtagelse er kemikalier, som er under tryk i aerosolbeholdere og derfor ikke kan opsamles på grund af fordampning. I sådanne tilfælde bør øjet holdes åbent, og testkemikaliet indgives i øjet med et enkelt pust på ca. et sekund fra en afstand af 10 cm direkte foran øjet. Afstanden kan variere, afhængigt af trykket i aerosolbeholderen og dens indhold. Der bør drages omsorg for at undgå skade på øjet som følge af trykket i spraydåsen. I visse tilfælde kan der være brug for at vurdere potentialet for »mekanisk« skade på øjet forårsaget af forstøvningens styrke.

▼M7

Den afgivne dosis fra aerosolbeholderen kan vurderes ved at simulere prøven på følgende måde: Kemikaliet sprøjtes på vejepapir gennem en åbning på størrelse med et kaninøje placeret umiddelbart foran papiret. Papirets vægtforøgelse anvendes som omtrentligt mål for den mængde, der tilføres øjet ved forstøvning. For flygtige kemikalier kan dosis vurderes ved vejning af den modtagende beholder før og efter udtagning af testkemikaliet.

Indledende test (in vivo-test af øjenirritation/-ætsning i et dyr)

Det anbefales stærkt, at in vivo-testen indledningsvist kun udføres i et dyr (se Supplement til denne forsøgsmetode: Sekventiel teststrategi for øjenirritation og ætsning). Observationerne bør give mulighed for at bestemme styrke og reversibilitet, inden der foretages en verifikationstest på et andet dyr.

Viser denne test, at kemikaliet virker ætsende eller stærkt irriterende på øjet ved brug af den beskrevne fremgangsmåde, bør der ikke udføres yderligere test for øjenirritation.

Verifikationstest (in vivo-øjenirritationstest i yderligere dyr)

Har den indledende test ikke vist ætsende eller stærkt irriterende virkning, bør den irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr. Observeres der i den indledende test en stærkt irriterende virkning, anbefales det at udføre dette sekventielt i et dyr ad gangen frem for at eksponere yderligere to dyr samtidig. Udviser det andet dyr ætsning eller stærk irritation, standses testen. Hvis resultaterne fra det andet dyr er tilstrækkelige til, at der kan bestemmes en fareklassificering, bør der ikke udføres yderligere forsøg.

Observationsperiode

Observationsperioden bør være tilstrækkelig lang til, at de observerede virkningers omfang og reversibilitet kan vurderes fuldt ud. Testen bør imidlertid afsluttes, når som helst dyrene viser tegn på stærk smerte eller lidelser (8). For at bestemme reversibiliteten af virkningerne bør dyrene sædvanligvis observeres indtil 21 dage efter indgivelse af testkemikaliet. Observeres reversibilitet inden 21 dage, bør testen afsluttes på dette tidspunkt.

Kliniske observationer og klassificering af øjenrespons

Øjnene bør vurderes grundigt med henblik på tilstedeværelse eller fravær af øjenlæsioner, en time efter det kemiske stof er påført, efterfulgt af mindst en daglig evaluering. Dyrene bør evalueres flere gange dagligt i de første tre dage for at sikre, at beslutninger om at afslutte testen træffes i tide. Forsøgsdyrene bør under hele undersøgelsen vurderes regelmæssigt for kliniske tegn på smerte og/eller lidelse (f.eks. tager poterne op til øjet eller gnider i øjet, overdreven blinken, overdreven tåredannelse) (9) (10) (11) mindst to gange dagligt med mindst seks timer mellem observationerne eller om nødvendigt oftere. Dette er nødvendigt for at i) foretage en tilstrækkelig vurdering af, om dyrene viser tegn på smerte og lidelse, for at kunne træffe informerede beslutninger om behovet for at øge doseringen af analgetika og ii) vurdere, om dyrene viser tegn på etablerede humane endepunkter for at træffe informerede beslutninger om, hvorvidt det er hensigtsmæssigt at aflive dyrene humant, og sikre, at sådanne beslutninger træffes i tide. Fluoresceinfarvning bør anvendes rutinemæssigt, og der bør, hvor det findes hensigtsmæssigt (f.eks. til vurdering at skadens dybde ved ulceration af cornea), anvendes en spaltelampe som hjælp til at finde og måle skaden

▼M7

på øjet og vurdere, om de etablerede endepunktkriterier for human aflivning er opfyldt. Der kan indsamles digitale billeder af observerede læsioner til reference og som permanent registrering af omfanget af øjenskaden. Dyrene bør ikke forblive længere i forsøget, end indtil dette har givet definitive oplysninger. Dyr, som viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte, bør omgående aflives humant, og testkemikaliet vurderes tilsvarende.

Når følgende øjenlæsioner optræder efter instillation af testkemikaliet, bør dyret aflives humant (se tabel 1 for at få en beskrivelse af læsionsgrader): perforation af cornea eller nævneværdig ulceration af cornea, herunder staphylom; blod i forreste øjenkammer; uklarhed af cornea af grad 4; manglende respons på lys (irisrespons grad 2), persisterende i 72 timer; ulceration af conjunctivaslimhinden; nekrose af conjunctivae eller blinkhinde; rynker i cornea. Begrundelsen herfor er, at sådanne læsioner sædvanligvis er irreversible. Endvidere anbefales det, at følgende øjenlæsioner anvendes som humane endepunkter for at afslutte undersøgelser inden udløbet af den planlagte obervationsperiode på 21 dage. Disse læsioner anses for at være tegn på svært irriterende eller ætsende skader og skader, som ikke forventes at reversere fuldt ud ved udgangen af den 21 dage lange observationsperiode: alvorlig dybde af skaden (f.eks. ulceration af cornea, der strækker sig ud over de overfladiske lag af stroma), limbusdestruktion > 50 % (påvist ved afblegning af conjunctivalvæv) og alvorlig øjeninfektion (purulent sekretion). En kombination af: vascularisation af overfladen af cornea (dvs. pannus); område med fluoresceinfarvning, der ikke mindskes over tid baseret på en daglig vurdering; og/eller manglende re-epithelialisering, fem dage efter testkemikaliet er påført, kan også betragtes som et potentielt nyttigt kriterium, der påvirker den kliniske beslutning om at afslutte undersøgelsen tidligt. Hver for sig er disse resultater imidlertid ikke tilstrækkelige til at afslutte undersøgelsen tidligt. Når der er identificeret en alvorlig øjenskade, bør en tilstedeværende eller kvalificeret laboratoriedyrlæge eller personale, som er uddannet til at identificere kliniske læsioner, konsulteres med henblik på en klinisk undersøgelse for at fastslå, om kombinationen af disse virkninger giver grund til at afslutte undersøgelsen tidligt. Graden af øjenrespons (conjunctivae, cornea og iris) bør indhentes og registreres 1, 24, 48 og 72 timer efter påføring af testkemikaliet (tabel 1). For dyr, som ikke udvikler øjenlæsioner, kan forsøget tidligst afsluttes tre dage efter instillation. Dyr med øjenlæsioner, der ikke er alvorlige, bør observeres, indtil læsionerne forsvinder, eller i 21 dage, på hvilket tidspunkt testen afsluttes. Observationerne bør foretages og registreres efter mindst 1 time, 24 timer, 48 timer, 72 timer, 7 dage, 14 dage og 21 dage med henblik på at fastslå status for læsioner og deres reversibilitet eller irreversibilitet. Der bør foretages hyppigere observationer, hvis det er nødvendigt for at afgøre, hvorvidt forsøgsdyret bør aflives af humane grunde eller fjernes fra testen på grund af negative resultater.

Graden af øjenlæsioner (tabel 1) bør registreres ved hver undersøgelse. Alle andre læsioner i øjet (f.eks. pannus, farvning, ændringer i det forreste øjenkammer) og systemiske negative virkninger bør ligeledes rapporteres.

Undersøgelse af respons kan lettes ved brug af lup-briller, håndspaltelampe, binokulært mikroskop eller andre hensigtsmæssige hjælpemidler. Efter registrering af observationerne i 24 timer kan øjnene undersøges yderligere med fluorescein.

Klassificeringen af øjenrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af øjenrespons og for at bistå prøvningslaboratorierne og dem, som foretager og fortolker observationerne, skal observationerne foretages af personer, som er tilstrækkeligt fortrolige med det anvendte score-system. Klassificeringen af øjenrespons foretages blindt.

▼M7

DATA OG RAPPORTERING

Vurdering af resultater

Scoreværdierne for øjenirritation bør vurderes i tilknytning til læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet. De enkelte scoreværdier repræsenterer ikke en absolut standard for et kemikalies irritationsfremkaldende egenskaber, da andre virkninger af testkemikaliet ligeledes vurderes. I stedet bør de enkelte scoreværdier betragtes som vejledende værdier, som kun er meningsfulde, når de støttes af en fuldstændig beskrivelse og evaluering af alle observationer.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Begrundelsen for in vivo-test: weight-of-the-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle teststrategi:

— beskrivelse af relevante oplysninger fra foreliggende tidligere forsøg

— oplysninger afledt af de enkelte trin i teststrategien

— beskrivelse af udførte in vitro-test med detaljeret beskrivelse af de anvendte metoder og resultater opnået med test-/referencekemikalier

— beskrivelse af den udførte in vivo-test af hudirritation/-ætsning med angivelse af opnåede resultater

— weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-test.

Testkemikalie:

— identifikationsdata (f.eks. kemisk betegnelse og eventuelt CAS-nummer, renhed, kendte urenheder, kilde, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. pH, flygtighed, opløselighed, stabilitet, reaktion med vand)

— for blandinger bør bestanddelene identificeres, herunder stoffernes identifikationsdata (f.eks. kemisk betegnelse og eventuelt CAS-nummer) og deres koncentrationer

— anvendt dosis.

Bærestof:

— identifikation, koncentration (i givet fald), anvendt volumen

— begrundelse for valg af bærestof.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme, begrundelse for anvendelse af andre dyr end albinokaniner

— hvert dyrs alder ved testens begyndelse

— antal dyr af hvert køn i testgruppe og kontrolgruppe (hvis nødvendigt)

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning

— oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

▼M7

Anæstetika og analgetika:

— doser og tidspunkter, hvor lokalanæstetika og systemiske analgetika blev indgivet

— hvis et lokalanæstetikum benyttes, identifikation, renhed, art og potentiel interaktion med testkemikaliet.

Resultater:

— beskrivelse af den anvendte metode til fastlæggelse af irritationsscore på hvert observationstidspunkt (f.eks. håndspaltelampe, binokulært mikroskop, fluorescein)

— angivelse i tabelform af irritations-/ætsningsresponsdata for hvert dyr på hvert observationstidspunkt, indtil dyret tages ud af testen

— forklarende beskrivelse af graden og arten af den observerede irritation eller ætsning

— beskrivelse af alle andre observerede læsioner i øjet (f.eks. karindvækst, pannusdannelse, adhæsion, farvning)

— beskrivelse af ikke-okulære lokale og systemiske negative virkninger, registrering af kliniske tegn på smerte og lidelse, digitale fotografier og eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultater

Fortolkning af resultaterne

Resultaterne af øjenirritationsundersøgelser i laboratoriedyr kan kun i begrænset omfang overføres til mennesker. I mange tilfælde er albinokaniner mere følsomme end mennesker for øjenirriterende eller -ætsende stoffer.

Fortolkning af data bør ske med forbehold, så man undgår at medtage irritation forårsaget af sekundær infektion.

LITTERATUR

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

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

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

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

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

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

(7) Kapitel B.4 i dette bilag, *Akut hudirritation/-ætsning*.

▼M7

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

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

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

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

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

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

(13) Kapitel B.40 i dette bilag, *In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).*

(14) Kapitel B.40.A i dette bilag, *In vitro-hudætsning: test med human hudmodel*.

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

(16) Kapitel B.47 i dette bilag, *Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) til identifikation af i)* kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, *og ii)* kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

(17) Kapitel B.48 i dette bilag, Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE-forsøgsmetoden) til identifikation af *i)* kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

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

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006. EUT L353, 1-1355.

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

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

▼M7

Tabel 1

Klassificering af øjenskader

Cornea	Grad
Uklarhed: graden af uklarhed bør aflæses i det tætteste område (*)	
Ingen ulceration eller uklarhed	0
Spredte eller diffuse uklare områder (ikke bestående i en let mattering af den normale glans); detaljer i iris klart synlige	1
Let skelneligt halvgennemsigtigt område; detaljer i iris let slørede	2
Område med perlemorsglans; ingen detaljer i iris synlige; pupilstørrelse kan knapt skelnes	3
Uklar cornea; iris ikke skelnelig gennem uklarheden	4
Maksimum: 4	
Iris	
Normal	0
Markant fordybede rugae, kongestion, hævelse, moderat hyperæmi omkring cornea; eller injektion; iris reagerer på lys (træg lysrespons anses for en virkning)	1
Blødning, massiv ødelæggelse eller ingen reaktion på lys	2
Maksimum: 2	
Conjunctivae	
Rødme (af conjunctiva palpebrae og conjunctiva bulbi; bortset fra cornea og iris)	
Normal	0
Nogle blodkar hyperæmiske (injektion)	1
Diffus, blodrød farve; de enkelte kar ikke let skelnelige	2
Diffus oksekødsfarvet	3
Maksimum: 3	
Chemosis	
Hævelse (omkring øjenlåg og/eller blinkhinder)	
Normal	0
Nogen unormal hævelse	1
Tydelig hævelse med delvis udkrængning af øjenlåg	2
Hævelse med øjenlåg omtrent halvt lukket	3
Hævelse med øjenlåg mere end halvt lukket	4
Maksimum: 4	

(*) Området med cornea-uklarhed bør angives.

▼M7

Tillæg

DEFINITIONER

Syre/base-reserve: For sure præparater, mængden (g) af natriumhydroxid/100 g præparat, der kræves for at frembringe en bestemt pH-værdi. For basiske præparater, mængden (g) af natriumhydroxid svarende til g svovlsyre/100 g præparat, der kræves for at frembringe en bestemt pH-værdi (Young *et al.* 1988).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Ikke-irriterende stoffer: Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III eller GHS-kategori 1, 2, 2A eller 2B eller EU-kategori 1 eller 2 (17) (18) (19).

Øjenætsende stof: a) Et kemikalie, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

Øjenirriterende stof: a) et kemikalie, der forårsager en reversibel ændring i øjet, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, eller øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 2, 2A eller 2B eller EU-kategori 2 (17) (18) (19).

Stærkt øjenirriterende stof: a) et kemikalie, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet, som ikke er forsvundet inden for 21 dage efter påføring, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Trinvis strategi: Ved anvendelse af den trinvise teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Weight-of-the-evidence (proces): Styrker og svagheder ved indsamling af oplysninger anvendes som grundlag for en konklusion, der muligvis ikke kan ses ud fra de individuelle data.

▼M7

SUPPLEMENT TIL FORSØGSMETODE B.5 ([1])

SEKVENTIEL TESTSTRATEGI FOR ØJENIRRITATION OG -ÆTSNING

Generelle betragtninger

Såvel hensynet til den videnskabelige kvalitet som til dyrenes velfærd taler for at undgå unødvendig brug af dyr og at minimere alle test, som kan forventes at fremkalde svære responser i dyr. Alle oplysninger om et kemikalies potentielle øjenætsende og -irriterende egenskaber bør vurderes, før in vivo-test overvejes. Der foreligger muligvis allerede tilstrækkelige vidnesbyrd til, at testkemikaliets potentiale for ætsning eller irritation af øjnene kan klassificeres, uden at der er behov laboratorieforsøg udført med dyr. Ved hjælp af weight-of-the-evidence-analyse og en sekventiel teststrategi kan behovet for in vivo-test således nedsættes til et minimum, navnlig når kemikaliet forventes at fremkalde svære responser.

Det anbefales, at de foreliggende oplysninger om kemikaliers øjenirriterende og -ætsende egenskaber vurderes ved weight-of-the-evidence-analyse for at afgøre, om der ud over in vivo-øjenundersøgelser bør udføres supplerende undersøgelser til nærmere karakterisering af et sådant potentiale. Når yderligere undersøgelser er nødvendige, anbefales det at benytte den sekventielle teststrategi til fastlæggelse af de relevante forsøgsdata. For ikke tidligere testede stoffer bør den sekventielle teststrategi anvendes til at fastlægge det sæt data, som er nødvendigt til vurdering af stoffets potentiale for øjenirritation/-ætsning. Den i dette bilag beskrevne indledende teststrategi er udviklet på en OECD-workshop (1). Den er senere blevet bekræftet og udvidet i form af Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtoges på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier i november 1998 (2), og blev ajourført af en OECD-ekspertgruppe i 2011.

Skønt denne teststrategi ikke indgår som en del af forsøgsmetode B.5, er det den anbefalede strategi til bestemmelse af øjenirritation/-ætsning. Strategien repræsenterer både bedste praksis og en etisk standard for in vivo-test af øjenirritation/-ætsning. Forsøgsmetoden giver vejledning i udførelse af in vivo-test og sammenfatter de faktorer, som man bør tage i betragtning, før en sådant test overvejes. Strategien tilvejebringer en weight-of-the-evidence-metode til evaluering af foreliggende oplysninger om testkemikaliets øjenirriterende/-ætsende egenskaber og en trinvis fremgangsmåde til at generere relevante data om kemikalier, hvor der er behov for yderligere undersøgelse, eller som ikke er blevet undersøgt. Strategien indebærer, at der først udføres validerede og anerkendte in vivo- eller ex vivo-test, og derefter forsøgsmetode B.4, alt efter omstændighederne (3) (4).

Beskrivelse af den trinvise teststrategi

Før man iværksætter test som led i den sekventielle teststrategi (vist i figuren), bør alle foreliggende oplysninger vurderes for at afgøre nødvendigheden af in vivo-øjentest. Skønt vurdering af enkeltparametre (f.eks. ekstremt pH) i sig selv kan tænkes at give væsentlige oplysninger, bør alle de foreliggende oplysninger

([1]) Yderligere oplysninger om anvendelse af en integreret teststrategi for øjenirritation i henhold til REACH findes i ECHA's vejledning om informationskrav og kemikaliesikkerhedsvurdering (Guidance on information requirements and chemical safety assessment), kapitel R.7a: Specifik vejledning i endepunkter http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

betragtes under ét. Som grundlag for en afgørelse baseret på weight-of-the-evidence bør alle relevante oplysninger om virkningerne af det pågældende kemikalie og dets strukturelle analoge stoffer evalueres, og en begrundelse for afgørelsen bør fremlægges. Primært bør foreliggende oplysninger om kemikaliets virkning på dyr og mennesker tillægges vægt, efterfulgt af resultaterne af in vivo- eller ex vivo-test. Når det på nogen måde er muligt, bør in vivo-undersøgelser af ætsende kemikalier undgås. I teststrategien bør følgende faktorer tages i betragtning;

Vurdering af foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder (trin 1).

Foreliggende data fra mennesker, f.eks. kliniske undersøgelser eller arbejdsmiljø-undersøgelser, case-undersøgelser og/eller data fra dyreforsøg fra f.eks. øjenstudier og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder for øjenirritation/-ætsning bør primært tages i betragtning, da de giver oplysninger, som direkte vedrører virkninger på øjnene. Derefter bør foreliggende data fra undersøgelser af hudætsning/-irritation hos mennesker og/eller i dyr og/eller in vitro-undersøgelser fra validerede og internationalt anerkendte metoder for hudætsning vurderes. Kemikalier med kendt ætsende eller svært irriterende virkning på øjet bør ikke instilleres i øjnene på dyr, hvilket ligeledes gælder kemikalier, som virker ætsende eller svært irriterende på huden, da disse også må anses for at virke ætsende og/eller irriterende på øjnene. Kemikalier, for hvilke der foreligger tilstrækkelig dokumentation for manglende ætsende og irriterende virkning fra tidligere øjenstudier, bør heller ikke testes i in vivo-øjenstudier.

Analyse af struktur/aktivitetrelationer (trin 2).

Resultater fra eventuelle undersøgelser af strukturelt beslægtede kemikalier bør tages i betragtning. Når der for strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer foreligger tilstrækkelige data fra mennesker og/eller dyr til at bestemme deres øjenætsende/-irriterende potentiale, kan testkemikaliet antages at ville frembringe samme respons. I sådanne tilfælde behøver testkemikaliet ikke nødvendigvis testes. Negative data fra undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer udgør ikke tilstrækkeligt bevis for fravær af ætsende eller irriterende egenskaber af et kemikalie i den sekventielle teststrategi. Potentialet for ætsende og irriterende virkning på både hud og øjne bør fastlægges ved validerede og anerkendte metoder til analyse af struktur/aktivitetrelationer.

Fysisk-kemiske egenskaber og kemisk reaktivitet (trin 3).

Kemikalier, som udviser en ekstrem pH-værdi som $\leq$2,0 eller $\geq$ 11,5, kan have stærke lokale virkninger. Hvis en ekstrem pH-værdi er grundlaget for at udpege et kemikalie som ætsende eller irriterende for øjnene, kan også dets syre/base-reserve (eller bufferkapacitet) tages i betragtning (5) (6) (7). Tyder kemikaliets bufferkapacitet på, at det muligvis ikke virker ætsende på øjnene (dvs. kemikalier med ekstrem pH-værdi og lav syre/basereserve), bør dette bekræftes ved yderligere test, fortrinsvis med brug af en valideret og anerkendt in vitro- eller ex vivo-test (jf. punkt 10).

Hensyntagen til andre foreliggende oplysninger (trin 4).

Alle foreliggende oplysninger om systemisk toksicitet ved påføring på huden vurderes på dette trin. Testkemikaliets akutte toksicitet ved optagelse gennem huden bør ligeledes tages i betragtning. Er testkemikaliet påviseligt meget toksisk ved optagelse gennem huden, behøver det ikke nødvendigvis testes i øjnene. Skønt der ikke nødvendigvis er sammenhæng mellem akut toksicitet ved optagelse gennem huden og øjenirritation/ætsning, kan man gå ud fra, at

▼M7

når et agens er meget toksisk ved optagelse gennem huden, vil det ligeledes vise sig meget toksisk ved instillation i øjet. Sådanne oplysninger kan ligeledes tages i betragtning mellem trin 2 og 3.

Vurdering af kemikaliets hudætsende egenskaber, hvis dette også er et lovkrav (trin 5).

Kemikaliets hudætsende og svært irriterende egenskaber bør først vurderes i overensstemmelse med forsøgsmetode B.4 (4) og det ledsagende bilag (8), herunder anvendelse af validerede og internationalt anerkendte in vitro-forsøgsmetoder vedrørende hudætsning (9) (10) (11). Hvis kemikaliet har vist sig at forårsage ætsning eller svær hudirritation, kan det også anses for at være ætsende eller svært irriterende for øjnene. Yderligere test er således ikke påkrævet. Er kemikaliet ikke ætsende eller stærkt hudirriterende, bør der udføres en in vivo- eller ex vivo-øjentest.

Resultater af in vitro- eller ex vivo-test (trin 6).

Kemikalier, som har udvist ætsende eller stærkt irriterende egenskaber i en in vitro- eller ex vivo-test (12) (13), som er valideret og internationalt anerkendt specielt til vurdering af øjenætsende/-irriterende virkninger, behøver ikke testes i dyreforsøg. Sådanne kemikalier må antages at ville frembringe tilsvarende svære virkninger in vivo. Foreligger der ikke validerede og anerkendte in vitro- og/eller ex vivo-test, springes trin 6 over, og der fortsættes direkte med trin 7.

In vivo-test i kaniner (trin 7 og 8).

In vivo-øjentest bør begynde med en indledende test i et dyr. Viser kemikaliet sig i denne test ætsende eller stærkt irriterende på øjet, bør yderligere test ikke udføres. Viser testen ingen ætsende eller ingen stærkt irriterende virkninger, udføres en verifikationstest i yderligere to dyr. Afhængigt af resultatet af verifikationstesten kan der være behov for yderligere test. [Se forsøgsmetode B.5]

▼M7

EN STRATEGI FOR TEST OG VURDERING AF ØJENIRRITATION/-ÆTSNING

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
1	Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser virkninger på øjnene.	Svær øjenskade	Apikalt endepunkt: bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
		Øjenirriterende	Apikalt endepunkt: bør anses for at virke irriterende på øjnene. Ingen test nødvendig.
		Virker ikke ætsende/irriterende på øjnene	Apikalt endepunkt: anses for ikke at virke ætsende eller irriterende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser ætsende virkninger på huden.	Hudætsende	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser stærkt irriterende virkninger på huden.	Svært hudætsende	Bør anses for øjenirriterende. Ingen test nødvendig.
	↓		
	Oplysninger foreligger ikke eller kan ikke danne grundlag for en konklusion		
	↓		
2	Foretag analyse af struktur/aktivitetrelationer for ætsende/irriterende virkning på øjnene	Svære øjenskader må forventes	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
		Irritation af øjnene må forventes	Bør anses for øjenirriterende. Ingen test nødvendig.
	Overvej struktur/aktivitetrelationer for hudætsning	Må forventes at være hudætsende	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	↓		
	Der kan ikke angives nogen forudsigelser, forudsigelserne kan ikke danne grundlag for en konklusion, eller forudsigelserne er negative		
	↓		
3	pH måles (bufferkapacitet, hvis det er relevant)	pH ≤ 2 eller ≥ 11,5 (med høj bufferkapacitet, hvis det er relevant)	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	↓		
	2 < pH < 11,5, eller pH ≤ 2,0 eller ≥ 11,5 med ringe eller ingen bufferkapacitet, hvis det er relevant		
	↓		
4	Overvej eksisterende data for systemisk toksicitet ved optagelse gennem huden	Stærkt toksisk ved de koncentrationer, som vil blive anvendt ved test i øjet.	Kemikaliet for toksisk til at kunne testes. Ingen test nødvendig.

▼M7

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
	↓		
	Oplysninger herom foreligger ikke, eller kemikaliet er ikke ret toksisk		
	↓		
5	Potentielle hudætsende egenskaber vurderes eksperimentelt ifølge teststrategien i kapitel B.4 i dette bilag, hvis der er lovkrav om dette	Ætsende eller stærkt irriterende respons	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	Kemikaliet virker ikke ætsende eller stærkt irriterende på huden		
	↓		
6	Udfør en eller flere validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-øjentest	Ætsende eller stærkt irriterende respons	Kemikaliet må antages at være ætsende eller stærkt irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ætsende/stærkt irriterende kemikalier, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig.
		Irritationsrespons	Kemikaliet må antages at være irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ætsende, stærkt irriterende eller irriterende kemikalier korrekt, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig.
		Ikke-irritationsrespons	Kemikaliet må antages ikke at være irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ikke-irriterende kemikalier korrekt og korrekt skelne disse fra kemikalier, som er irriterende, stærkt irriterende eller ætsende for øjnene, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	En eller flere validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-øjentest kan ikke danne grundlag for en konklusion		
	↓		

▼M7

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
7	Udfør en indledende in vivo-øjentest i en kanin	Svær øjenskade	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	Ingen alvorlige skader eller ingen respons		
	↓		
8	Udfør kontroltest i yderligere et eller to dyr.	Ætsende eller irriterende	Må anses for at virke ætsende eller irriterende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
		Ikke ætsende eller irriterende	Må anses for ikke at virke irriterende eller ætsende på øjnene. Inden yderligere test nødvendig.

LITTERATUR

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

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

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

(4) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.

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

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

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

(8) Supplement til kapitel B.4 i dette bilag: Sekventiel testningsstrategi for hudirritation og ætsning.

(9) Kapitel B.40 i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).

(10) Kapitel B.40.A i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: test med human hudmodel.

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

▼**M7**

(12) Kapitel B.47 i dette bilag, *Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) til identifikation af i)* kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, *og ii)* kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

(13) Kapitel B.48 i dette bilag, Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE-forsøgsmetoden) til identifikation af *i)* kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

▼B

B.6. **HUDSENSIBILISERING**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Bemærkninger:

I et system for klassifikation af den toksicitet, der er relevant for folkesundheden, er det af stor betydning at have følsomme test, som kan afsløre stoffer, der kan virke hudsensibiliserende på mennesker.

Der findes ikke én enkelt testmetode, hvorved man med sikkerhed kan identificere alle stoffer, som kan virke hudsensibiliserende på mennesker, og som kan anvendes til alle stoffer.

Der skal ved valg af test tages hensyn til en række faktorer såsom stoffets fysiske egenskaber, herunder dets evne til at trænge gennem huden.

Der er udviklet to testtyper med anvendelse af marsvin: adjuvanstypen, hvor en allergisk tilstand forstærkes, når teststoffet opløses eller opslæmmes i Freunds komplette adjuvans (FCA), og typen uden adjuvans.

Test af adjuvanstypen vil normalt forudsige et stofs sandsynlige hudsensibiliserende virkning hos mennesker mere præcist end de metoder, hvor der ikke benyttes Freunds komplette adjuvans, og bliver derfor foretrukket.

Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT) er en meget anvendt test af adjuvanstypen. Skønt en række andre metoder kan benyttes til at undersøge et stofs potentielle hudsensibiliserende virkning, er GPMT den foretrukne metode af adjuvanstypen.

Test uden adjuvans (hvor Buehlertesten er den foretrukne) bliver for mange kemiske stofgrupper anset for at være mindre følsom.

Der kan i visse tilfælde, være gode grunde til at vælge Buehlertesten med lokal påføring i stedet for den intradermale injektion, der benyttes i maksimeringstesten på marsvin. Der skal gives en videnskabelig begrundelse for anvendelse af Buehlertesten.

I denne metode beskrives maksimeringstesten på marsvin (GPMT) og Buehlertesten. Der kan anvendes andre metoder, forudsat at de er tilstrækkeligt validerede, og at valget er videnskabeligt begrundet.

Hvis testresultatet i en af de anerkendte screeningstest er positivt, er det tilladt at betegne stoffet som potentielt sensibiliserende og det er måske ikke nødvendigt at udføre yderligere marsvineforsøg. Hvis stoffet er negativt i en af de anerkendte screeningsmetoder, skal der udføres en marsvinetest, hvor der bruges de fremgangsmåder, der er beskrevet i denne testmetode.

Se også den generelle indledning til del B.

▼B

1.2. DEFINITIONER

Hudsensibilisering: (allergisk kontaktdermatitis) er en immunologisk hudreaktion på et stof. Hos mennesker kan reaktionerne være karakteriseret ved kløen, erytem, ødem, papler, vesikler, blærer eller en kombination heraf. Andre arter kan have andre reaktioner f.eks. kun erytem og ødem.

Induktionseksponering: eksperimentel eksponering af et individ for et teststof med henblik på fremkaldelse af hypersensibel tilstand.

Induktionsperiode: tidsrum på mindst en uge efter en induktionseksponering, under hvilken en hypersensibel tilstand kan være opstået.

Provokationseksponering: eksperimentel eksponering — efter en induktionsperiode — af et tidligere behandlet individ for et teststof til konstatering af, om individet reagerer hypersensibelt.

1.3. REFERENCESTOFFER

Den anvendte forsøgsmetodes følsomhed og pålidelighed vurderes hver sjette måned med anvendelse af stoffer, der vides at have mildt til moderat hudsensibiliserende egenskaber.

I en velgennemført test bør der for mildt/moderat sensibiliserende stoffer ventes en reaktion på mindst 30 % i en adjuvanstest og mindst 15 % i en test uden adjuvans.

Følgende stoffer foretrækkes:

CAS-nummer	Einecs-nummer	Einecs-navn	Fælles navn
101-86-0	202-983-3	α-hexylkanelaldehyd	α-hexylkanelaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercapto-benzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocain	norcain

Under visse omstændigheder vil andre kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Forsøgsdyrene udsættes først for teststoffet med intradermale injektioner og/eller epidermal applikation (induktionseksponering). Efter en hvileperiode på 10-14 dage (induktionsperiode), hvor der kan udvikle sig immunrespons, udsættes dyrene for en provokationsdosis. Omfanget og graden af hudens reaktion på provokationseksponeringen i forsøgsdyrene sammenlignes med resultater fra kontroldyr, der har fået placebo-behandling i induktionsperioden og dernæst er eksponeret for provokationsdosis.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODERNE

Hvis det anses for nødvendigt at fjerne teststoffet, bør dette gøres med vand eller et passende opløsningsmiddel, uden at den fremkaldte reaktion ændres eller overhuden beskadiges.

▼B

1.5.1. *Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT)*

1.5.1.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøgets afslutning.

1.5.1.2. Forsøgsbetingelser

1.5.1.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.1.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst ti dyr og kontrolgruppen af mindst fem dyr. Hvis der anvendtes mindre end tyve forsøgsmarsvin og ti kontrolmarsvin og det ikke er muligt at konkludere, at teststoffet er sensibiliserende, anbefales det stærkt at teste stoffet i yderligere dyr, så der i alt er tale om mindst tyve forsøgsdyr og ti kontroldyr.

1.5.1.2.3. Dosisniveauer

Den koncentration af teststoffet, der anvendes ved hver induktionseksponertng, må ikke forårsage systemiske gener og skal være den størst mulige, der forårsager mild til moderat hudirritation. Provokationskoncentrationen skal være den størst mulige, der ikke femkalder hudirritation. Hvis nødvendigt kan de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr. Det bør overvejes at bruge FCA-behand! ede dyr til dette formål.

1.5.1.3. Fremgangsmåde

1.5.1.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis i skulderpartiet — hvorfra hårlaget er fjernet — således, at hvert injektionspar består af en injektion på hver side af midterlinjen.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: teststoffet i et passende vehikel i den udvalgte koncentration.

Injektion 3: teststoffet i den valgte koncentration i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

I injektion 3 opløses vandopløselige stoffer i vandfasen før de blandes med FCA. Fedtopløselige eller uopløselige stoffer opslæmmes i FCA forud for blanding med den vandige fase. Teststoffets slutkoncentration skal være den samme som i injektion 2.

▼B

Injektion 1 og 2 placeres tæt på hinanden og nærmest ved hovedet, mens injektion 3 placeres i den bageste del af testområdet.

Dag 0 — kontrolgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis på samme måde som for forsøgsdyrene.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: det ufortyndede vehikel.

Injektion 3: en 50 vægtprocent formulering af vehiklet i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Dag 5-7 — forsøgsgruppe og kontrolgruppe

Hvis stoffet ikke er hudirriterende, fremkaldes der, ca. 24 timer inden den lokale induktionsapplikation, en lokal irritation ved behandling af testområdet med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaseline, efter klipning og/eller barbering.

Dag 6-8 — forsøgsgruppe

Testområdet klippes. Et stykke filtrerpapir (2 × 4 cm) gennemvædes med teststoffet, der er blandet med et passende vehikel, og anbringes på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer. Valget af vehikel skal begrundes. Faste stoffer pulveriseres og inkorporeres i et passende vehikel. Væske kan eventuelt anvendes direkte.

Dag 6-8 — kontrolgruppe

Testområdet klippes. Vehikel alene anbringes på tilsvarende måde på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer.

1.5.1.3.2. Provokation

Dag 20-22 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrenes flanke for hår. På forsøgsdyrenes ene side anbringes en lap eller en kapsel med teststoffet, og, hvis det er relevant, kan der også anbringes en lap eller en kapsel med rent vehikel på den anden side. Lapperne holdes i kontakt med huden i 24 timer med en okklusiv forbinding.

1.5.1.3.3. Observation og scoring: forsøgs- og kontrolgruppe

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, renses provokationsområdet og befries om nødvendigt for hår

— ca. 3 timer senere (ca. 48 timer efter påføring af provokationsdosis) observeres hudens reaktion, som registreres efter den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter denne observation foretages endnu en observation (72 timer), som registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendige at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

▼B

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnusson/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

1.5.2. *Buehlertest*

1.5.2.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøgets afslutning.

1.5.2.2. Forsøgsbetingelser

1.5.2.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.2.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst 20 dyr og kontrolgruppen af mindst 10 dyr.

1.5.2.2.3. Dosisniveauer

Der vælges en så høj koncentration af teststoffet for hver induktionseksponering, at der fremkaldes en mild, men ikke overdreven irritation. Provokationskoncentrationen bør være den størst mulige, der ikke fremkalder irritation. Hvis nødvendigt kan de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr.

For vandopløselige teststoffer kan der som vehikel bruges vand eller en fortyndet, ikke-irriterende opløsning af et overfladeaktivt stof. For andre teststoffer foretrækkes 80 % ethanol/vand til induktionseksponering og acetone til provokationseksponering.

1.5.2.3. Fremgangsmåde

1.5.2.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Testlappesystemet skal være gennemvædet med teststoffet i et egnet vehikel (valg af vehikel skal begrundes; væsker kan eventuelt anvendes direkte).

Testlappesystemet anbringes på testområdet og fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer.

▼B

Testlappesystemet skal være okklusivt. Et stykke gaze er passende: det kan være rundt eller firkantet, af en størrelse på ca. 4-6 cm^2. For at sikre okklusion foretrækkes det, at dyrenes bevægelsesfrihed begrænses med passende midler. Hvis der anvendes bandage, kan yderligere eksponering være nødvendig.

Dag 0 — kontrolgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Vehiklet alene anbringes på testområdet på tilsvarende måde som for forsøgsgruppen. Testlappesystemet fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer. Hvis det kan påvises, at der ikke er behov for en placebo-kontrolgruppe, kan en ikke forud testet kontrolgruppe (naive control group) bruges.

Dag 6-8 og 13-15 — forsøgs- og kontrolgruppen

På dag 6-8 og igen på dag 13-15 foretages samme påføring som på dag 0 på samme testområde (om nødvendigt befriet for hår).

1.5.2.3.2. Provokation

Dag 27-29 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrene for hår (klippes tæt) på den anden flanke. Bagest på flanken på forsøgs- og kontroldyrene anbringes en okklusiv lap eller kapsel med en passende mængde teststof i den højest mulige koncentration, der ikke fremkalder irritation.

Hvis det er relevant, anbringes desuden en okklusiv lap eller kapsel med vehikel alene forrest på flanken på såvel forsøgs- som kontroldyr. Lapper og kapsler fastholdes i kontakt med huden med en passende forbinding i seks timer.

1.5.2.3.3. Observation og scoring

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, befries provokationsområdet for hår

— ca. tre timer senere (ca. 30 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktion, og denne registreres i henhold til den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter observationen efter 30 timer (dvs. 54 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktioner igen og registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendigt at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. en uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

▼B

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnussen/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

2. **DATA (GPMT og Buehlertest)**

Data opstilles i tabelform, som angiver hudens reaktion ved hver enkelt observation af hver enkelt dyr.

3. **RAPPORTERING (GPMT og Buehlertest)**

Hvis der udføres en screeningtest inden marsvinetesten, skal der sammen med de resultater, der er opnået med test- og referencestofferne, gives en beskrivelse af eller henvisning til testen (f.eks. Mouse Ear Swelling Test (MEST)), herunder oplysninger om fremgangsmåde.

Forsøgsrapport (GPMT og Buehlertest)

Forsøgsrapporten skal om muligt indholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt marsvinestamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hver enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— metode til forberedelse af stedet for anbringelse af lap

— oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper

— resultat af forundersøgelse med konklusioner om de induktions- og provokationskoncentrationer, der skal anvendes i testen

— oplysninger om teststoffets tilberedning, påføring og fjernelse

— begrundelse for valg af vehikel

— de vehikel- og teststofkoncentrationer, der er anvendt til induktions- og provokationseksponering, og den samlede mængde stof, der er anvendt til induktion og provokation.

Resultater:

— resumé af resultaterne af den seneste følsomheds- og pålidelighedskontrol (jf. 1.3), herunder oplysninger om anvendt stof, koncentration og vehikel

▼B

— oplysninger om observationerne af hver enkelt dyr, herunder scoringssystem

— beskrivende redegørelse for de observerede virkningers art og styrke

— eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 406 fra OECD.

▼B

Tillæg

TABEL

Magnusson/Kligmans scoringsskala til vurdering af reaktionerne på provokationslappetest

0 = ingen synlig forandring

1 = afgrænset eller pletvis erytem

2 = moderat og sammenflydende erytem

3 = kraftigt erytem og hævelse.

▼M4

B.7. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL) HOS GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 407 (2008). Den oprindelige Test Guideline 407 blev vedtaget i 1981. I 1995 blev en revideret udgave vedtaget med henblik på at indhente flere informationer fra de anvendte forsøgsdyr, navnlig om neurotoksicitet og immunotoksicitet.

2. I 1998 indledte OECD en højtprioriteret aktivitet, der havde til formål at revidere de eksisterende Test Guidelines og udvikle nye Test Guidelines for screening og test af potentielle hormonforstyrrende stoffer (8). Et element af denne aktivitet var at opdatere de eksisterende OECD-retningslinjer for »toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere« (TG 407) med parametre, der kunne bruges til at påvise testkemikaliers hormonforstyrrende aktiviteter. Denne fremgangsmåde blev underkastet et omfattende internationalt program, som omfattede test af relevansen og anvendeligheden af de yderligere parametre, disse parametres effektivitet for kemikalier med (anti)østrogen, (anti)androgen og (anti)thyreoid aktivitet samt reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og de nye parametres interferens med de parametre, der krævedes i henhold til den tidligere TG 407. Den store datamængde, der blev indhentet herved, er samlet og evalueret i detaljer i en omfattende OECD-rapport (9). Denne opdaterede testmetode B.7 (svarende til TG 407) er resultatet af de erfaringer og resultater, der er opnået i løbet af det internationale testprogram. Denne testmetode gør det muligt at placere visse virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer i sammenhæng med andre toksiske virkninger.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. Efter at en akut toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Denne testmetode har til formål at undersøge virkningerne på en meget bred vifte af potentielle mål for toksicitet. Den skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen eksponering i en relativt begrænset periode, herunder virkninger på nervesystemet, immunsystemet og det endokrine system. Med hensyn til disse effektparametre tager metoden sigte på at identificere kemikalier med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nøjere, og kemikalier, der påvirker skjoldbruskkirtlens fysiologi. Den kan også tilvejebringe data om kemikalier, der påvirker mandlige og/eller kvindelige kønsorganer hos unge voksne dyr, og kan give en indikation af de immunologiske effekter.

4. Resultaterne af denne testmetode B.7 bør anvendes til fareidentifikation og risikovurdering. De resultater, der fås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (11). Metoden omfatter det grundlæggende forsøg vedrørende toksicitet ved gentagen dosering, der kan bruges til kemikalier, for hvilke et 90-dages forsøg ikke er berettiget (f.eks. når produktionsmængden ikke overstiger visse grænser), eller som et forforsøg forud for et langtidsforsøg. Eksponeringsvarigheden bør være 28 dage.

▼M4

5. Det internationale program, der blev gennemført med henblik på at validere parametre, der kan bruges til at påvise et testkemikalies potentielle hormonforstyrrende aktivitet, viste, at kvaliteten af de data, der indhentes ved hjælp af denne testmetode B.7, i høj grad afhænger af testlaboratoriets erfaring. Dette gælder specifikt for den histopatologiske bestemmelse af cykliske forandringer i de kvindelige kønsorganer og for bestemmelsen af vægten af de små hormonafhængige organer, der er vanskelige at dissekere. Der er udarbejdet vejledning om histopatologi (19). Den findes på OECD's offentlige websted for »Test Guidelines«. Den har til formål at hjælpe patologer i deres undersøgelser og øge testens sensitivitet. En lang række parametre blev vurderet at være indikative for endokrinrelateret toksicitet og er medtaget i testmetoden. Parametre, for hvilke der ikke forelå tilstrækkelige data til at påvise anvendelighed, eller som kun gav svage beviser i valideringsprogrammet på deres evne til at hjælpe med at påvise hormonforstyrrende stoffer, foreslås som valgfrie effektparametre (se tillæg 2).

6. På grundlag af data genereret i valideringsprocessen skal det understreges, at testens sensitivitet ikke er tilstrækkelig til at identificere alle stoffer med (anti)androgene eller (anti)østrogene virkemåder (9). Testen anvendes ikke i en livsfase, der er mest sensitiv over for hormonforstyrrelser. Ved hjælp af testmetoden blev der dog i løbet af valideringsprocesserne identificeret stoffer, som svagt og stærkt påvirker skjoldbruskkirtlens funktion, og stærkt og moderat hormonforstyrrende stoffer, der virker gennem østrogene eller androgene receptorer, men i de fleste tilfælde blev der ikke identificeret hormonforstyrrende stoffer, som svagt påvirker østrogene eller androgene receptorer. Den kan derfor ikke beskrives som en test til screening af hormonforstyrrende aktivitet.

7. Manglen på virkninger med tilknytning til disse virkemåder kan derfor ikke antages at være bevis for manglende virkning på det endokrine system. Hvad angår virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer, bør stofkarakterisering derfor ikke alene baseres på resultaterne af denne testmetode, men bør anvendes i en »weight of evidence«-tilgang, der bruger alle eksisterende data om et kemikalie til at karakterisere potentiel hormonforstyrrende aktivitet. Myndigheders afgørelser vedrørende hormonforstyrrende aktivitet (stofkarakterisering) bør derfor baseres på en bred tilgang og ikke alene resultaterne af anvendelsen af denne testmetode.

8. Det anerkendes, at alle dyreforsøg skal overholde lokale standarder for dyrepleje. De anførte beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og tilsidesættes af evt. strengere lokale bestemmelser. Nærmere anvisninger i human behandling af dyr findes i OECD (14).

9. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

10. Testkemikaliet administreres oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning. Et 28-dages forsøg tilvejebringer informationer om virkningerne af gentagen oral eksponering og kan angive behovet for yderligere forsøg med længere

▼M4

varighed. Det kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der skal vælges til forsøg med længere varighed. Data, der udledes ved hjælp af testmetoden, bør kunne anvendes til at karakterisere testkemikaliets toksicitet, indikere dosis-responsforholdet og bestemme det laveste dosisniveau (NOAEL).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

11. Rotten er den foretrukne gnaverart, selv om andre gnaverarter kan anvendes. Hvis de parametre, der er anført i denne testmetode B.7, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse. Selv om det er biologisk plausibelt, at andre arter reagerer på giftstoffer på næsten samme måde som rotter, kan brugen af mindre arter resultere i øget variabilitet som følge af de tekniske udfordringer, der er forbundet med dissekering af små organer. I det internationale valideringsprogram til påvisning af hormonforstyrrende stoffer var rotter den eneste anvendte art. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Doseringen bør begynde snarest muligt efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnittet for hvert køn. Hvis et forsøg med gentagen oral dosis gennemføres som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og herkomst i begge forsøg.

Opbevaring og fodring

12. Alle fremgangsmåder skal overholde lokale standarder for pleje af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke være over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet, når denne administrationsmåde anvendes. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur.

13. Foderet analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Forberedelse af dyrene

14. Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden behandlingsforsøget påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

15. Testkemikaliet indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Den orale administrationsmetode afhænger af forsøgets formål og testkemikaliets fysiske/kemiske/toksikokinetiske egenskaber.

▼M4

16. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

17. Der anvendes mindst 10 dyr (5 hunner og 5 hanner) ved hvert dosisniveau. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Det kan overvejes at udsætte en yderligere satellitgruppe på 10 dyr (5 af hvert køn) i kontrolgruppen og i gruppen med den højeste dosis, således at man kan observere evt. reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen.

Dosering

18. Generelt skal der anvendes mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe, men hvis andre data ikke giver anledning til at forvente virkning af en dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, kan en grænsetest udføres. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres et dosisbestemmende forsøg (»range finding«) (dyr af samme stamme og herkomst) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis.

19. Dosisniveauerne udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om testkemikaliet eller beslægtede kemikaliers toksicitet og (toksiko)kinetik. Den højeste dosis vælges med henblik på fremkaldelse af toksiske effekter, men ikke død eller alvorlig lidelse. Normalt vælges en faldende række dosisniveauer til påvisning af eventuelt dosisafhængigt respons og niveau, hvor skadelige effekter ikke kan observeres ved det laveste dosisniveau (NOAEL). Det optimale interval mellem to doser er ofte en faktor på 2-4, og tilføjelse af en fjerde forsøgsgruppe er ofte at foretrække frem for anvendelse af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 10) mellem dosisniveauerne.

20. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de immonologiske, neurologiske eller endokrine effektparametre fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

21. Hvis en test med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller, ved administration gennem foder eller drikkevand, en tilsvarende procentdel i foderet eller drikkevandet (baseret på bestemmelse af kropsvægten), udført efter nedenstående fremgangsmåde, ikke fremkalder erkendbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

▼M4

Administration af doser

22. Dyrene får testkemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 28 dage. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis forstærkes ved højere koncentration, skal variation af testvolumenet minimeres ved at justere koncentrationen, så volumenet er konstant ved alle dosisniveauer.

23. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Ved administration af testkemikaliet i foderet kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; den anvendte mulighed skal specificeres. Ved administration med sonde skal dosis gives på tilsvarende tidspunkt hver dag og efter behov justeres, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Hvis et forsøg med gentagen dosis anvendes som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør foderet være det samme i begge forsøg.

Observationer

24. Observationsperioden varer 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i mindst 14 dage uden indgift af testkemikalie, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.

25. Der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, om muligt på det eller de samme tidspunkter hver dag og under hensyntagen til, hvornår de forventede virkninger efter dosering er stærkest. Dyrenes sundhedstilstand registreres. Dyrene observeres for morbiditet og mortalitet mindst to gange om dagen.

26. Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle dyrene. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke. Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver gang. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at testbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (2).

27. I den fjerde eksponeringsuge vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (2) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (3) (4) (5), gribestyrke og motorisk aktivitet (7). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid anvendes.

▼M4

28. Funktionelle observationer i den fjerde eksponeringsuge kan udelades, hvis forsøget gennemføres som et forforsøg til et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet (90 dage). I så fald medtages de funktionelle observationer i det opfølgende forsøg. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra forsøget med gentagen dosis lette valget af dosisniveauer for et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet.

29. Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på toksicitet i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

30. Ved obduktion kan brunstcyklus for alle hundyr bestemmes (frivilligt) ved at tage vaginalt smear. Disse observationer skaffer viden om brunstcyklusfasen på aflivningstidspunktet og bidrager til den histologiske evaluering af østrogenfølsomt væv [se vejledning om histopatologi (19)].

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

31. Alle dyr skal vejes mindst én gang ugentlig. Mængden af foderindtagelse skal beregnes mindst én gang ugentlig. Hvis testkemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst én gang ugentlig.

Hæmatologisk undersøgelse

32. Følgende hæmatologiske undersøgelser foretages ved forsøgsperiodens afslutning: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, retikulocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og en måling af koaguleringsevne/tid. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliet eller dets putative metabolitter har eller mistænkes at have oxiderende egenskaber, omfatter methæmoglobinkoncentration og Heinz-legemer.

33. Der tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted, lige inden eller i forbindelse med aflivning af dyrene; prøverne opbevares under passende betingelser. Dyrene skal være fastende inden aflivning ([1]).

Klinisk biokemi

34. Klinisk-biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra alle dyr lige inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning (bortset fra dem, der er fundet døende, og/eller som er aflivet under forsøget). Undersøgelser af plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, alkalisk fosfatase, γ-glutamyltranspeptidase og glutamat-dehydrogenase), og galdesyrer. Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og bilirubin kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.

35. Følgende urinanalyser kan eventuelt udføres i forsøgets sidste uge til bestemmelse af: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Hvis der benyttes faste, bør analyserne udføres efter de funktionelle observationer i forsøgets fjerde uge.

▼M4

36. Yderligere bør man overveje at måle plasma- eller serummarkører for generel vævsskade. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis testkemikaliets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider, visse hormoner og cholinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

37. Selv om der i den internationale evaluering af de endokrinrelaterede effektparametre ikke blev påvist en klar fordel med henblik på bestemmelse af thyreoideahormoner (T3 og T4) og TSH, kan det være nyttigt at opbevare plasma- eller serumprøver for at måle T3, T4 og TSH (frivillig), hvis der er tegn på en virkning på hypofyse-thyroidea-aksen. Disse prøver kan opbevares nedfrosne ved – 20 °C. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer af hormonanalyserne:

— aflivningstidspunkt på grund af variation i hormonkoncentrationer i løbet af døgnet

— aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødig stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne

— analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

Definitiv identifikation af thyroidea-aktive kemikalier baseret på histopatologisk analyse er mere pålidelig end analyse baseret på hormonniveauer.

38. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på et tilsvarende tidspunkt på dagen. Det anbefales, at T3-, T4- og TSH-analyser overvejes i tilfælde af ændringer af histologi for thyroidea. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet. Det betyder, at der muligvis ikke kan opstilles effektivitetskriterier baseret på ensartede historiske data. Alternativet bør laboratorierne tilstræbe at holde variationskoefficienterne til kontrol under 25 for T3 og T4 og under 35 for TSH. Alle koncentrationer registreres i ng/ml.

39. Hvis der ikke foreligger passende data fra tidligere forsøg, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk-biokemiske variable, inden eksponering påbegyndes, eller så vidt muligt hos en gruppe dyr, der ikke er med i forsøgsgrupperne.

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

40. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testikler, bitestikler, prostata og vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands) (som én samlet enhed), thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Forsigtighed skal udvises ved trimming af prostata for at undgå punktering af de væskefyldte vesiculae seminales. Alternativt kan vesiculae seminales og prostata trimmes og vejes efter fiksering.

▼**M4**

41. To andre væv kan også vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring: ovarier (vådvægt) og uterus med cervix (vejledning om udtagning og forberedelse af uterusvæv med henblik på vejning findes i OECD TG 440 (18)).

42. Skjoldbruskkirtlens vægt (frivillig) bestemmes efter fiksering. Trimming bør også foretages omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse.

43. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 47): alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, øjne, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, skjoldbruskkirtel, spiserør og lunger (præserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, prostata og vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands), vagina, urinblære, lymfeknuder [ud over den nærmeste drænende lymfeknude bør en anden lymfeknude udtages på baggrund af laboratoriets erfaring (15)], perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, skeletmuskel og knogle med knoglemarv (afsnit eller som alternativt et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). Det anbefales, at testikler fikseres ved immersion i Bouins eller modificeret Davidsons fikseringsmiddel (16) (17). Tunica albuginea punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyle, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

44. Følgende væv kan give værdifulde indikationer på endokrinrelaterede virkninger: gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands), dorsolateral og ventral prostata), vagina, hypofyse, brystkirtler fra handyr, skjoldbruskkirtel og binyrer. Forandringer i brystkirtler fra handyr er ikke tilstrækkeligt dokumenteret, men denne parameter kan være meget sensitiv over for stoffer med østrogen virkemåde. Observation af organer/væv, der ikke er anført i afsnit 43, er frivillig (se tillæg 2).

45. I vejledningen om histopatologi (19) findes der flere oplysninger om dissekering, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

46. I det internationale testprogram blev der fremskaffet dokumentation for, at små hormonforstyrrende virkninger af kemikalier med ringe evne til at påvirke homeostase for kønshormoner kan identificeres ud fra forstyrrelse af synkroniseringen af brunstcyklussen i forskellige væv og ikke i så høj grad ud fra direkte histopatologiske forandringer i hundyrenes kønsorganer. Selv om der ikke blev fremskaffet definitivt bevis for sådanne virkninger, anbefales det, at bevis for mulig asynkronicitet i brunstcyklussen tages i betragtning ved fortolkningen af histopatologiske undersøgelser af æggestokke (follikulære celler og theca-granulosaceller), uterus, cervix og vagina. Cyklusfasen bestemt ved vaginalt smear kan, hvis den vurderes, også medtages i denne sammenligning.

▼M4

Histopatologi

47. En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

48. Alle makroskopiske læsioner undersøges.

49. Hvis der anvendes en satellitgruppe, skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen.

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

51. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Sammenligninger af virkningen i et dosisinterval bruges til at undgå brugen af flere t-test. Valg af statistisk metode skal finde sted i forbindelse med fastlæggelsen af forsøgets design.

52. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at variationskoefficienter beregnes for numeriske data, især for parametre med relation til bestemmelse af hormonforstyrrende effekter. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske forsøg evalueres.

Testrapport

53. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse

— begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning, opnået koncentration, præparatets stabilitet og homogenitet

▼**M4**

— oplysninger om administration af testkemikaliet

— eventuel omregning fra testkemikaliekoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Valgfrie undersøgte effektparametre

— liste over valgfrie undersøgte effektparametre.

Resultater:

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— kropsvægt ved aflivning og organvægte

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

▼M4

Tillæg 1

DEFINITIONER

Androgenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

Dosering: et generelt udtryk, som indbefatter dosis, doseringens hyppighed og anvendelsens varighed.

Dosis: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgift af testkemikaliet. De bør være tilstrækkelige til risikovurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udviklingen af svære toksiske virkninger og sandsynlig mortalitet.

NOAEL: forkortelsen for »no-observed-adverse-effect level« (niveau uden observerbare negative effekter), dvs. det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede negative virkninger.

Østrogenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Thyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

Validering: en videnskabelig proces, der har til formål at karakterisere de operationelle krav og begrænsninger vedrørende en testmetode og påvise dens pålidelighed og relevans i forbindelse med et bestemt formål.

▼M4

Tillæg 2

Anbefalede effektparametre til påvisning af hormonforstyrrende stoffer i testmetode B.7

Obligatoriske effektparametre	Valgfrie effektparametre
Vægt	
— Testikler — Bitestikler — Binyrer — Prostata og vesiculae seminales med prostata anterior	— Æggestokke — Uterus med cervix — Skjoldbruskkirtlen
Histopatologi	
— Gonader: — Testikler — Æggestokke — Sekundære kønsorganer: — Bitestikler — Prostata og vesiculae seminales med prostata anterior — Uterus med cervix — Binyrer — Skjoldbruskkirtlen — Vagina	— Vaginalt smear — Brystkirtler fra handyr — Hypofyse
Hormonmåling	
	— Cirkulationsniveau for T3 og T4 — Cirkulationsniveau for TSH

LITTERATUR:

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

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

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

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

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

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

▼M4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M4

B.8. SUBAKUT TOKSICITET (INHALATION): 28-DAGES FORSØG

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.8 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliets toksicitet ved inhalation efter gentagen eksponering i en begrænset periode (28 dage) og at fremskaffe data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af mindst fem hangnavere og fem hungnavere eksponeres i seks timer om dagen i 28 dage for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehikelkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 412 (2009). Den oprindelige Test Guideline 412 (TG 412) for subakut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.8 (som svarer til den reviderede TG 412) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.

2. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 28 dage. Data, der udledes af 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger [hvis de ikke efterfølges af et 90-dages forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation (kapitel B.29 i dette bilag)]. Dataene kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der skal vælges til forsøg med længere varighed, f.eks. 90-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af forsøg med akut toksicitet ved inhalation. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.

▼M4

4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad [se GD 39 (2)]. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.

5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet i forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

Forberedelse af dyrene

7. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

Dyreopdræt og -sundhed

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

▼M4

Inhalationskamre

9. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG

Grænsekoncentrationer

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekoncentrationer i 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskoncentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskoncentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Der gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekoncentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

Dosisbestemmende forsøg

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, kan det være nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-koncentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødig belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.

12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Højst tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 14 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-koncentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

▼M4

13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfaters hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner (T_3, T_4) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

Hovedforsøg

14. Hovedforsøget vedrørende subakut toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 17). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringsniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processer). Hver testgruppe består af mindst 10 gnavere (5 hanner og 5 hunner), der eksponeres for testkemikaliet i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på fire uger (samlet forsøgsvarighed på 28 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

15. De valgte målkoncentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:

— Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.

— De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graduerede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.

— Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ringe eller ingen toksisk virkning.

Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)

16. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af fem hanner og fem hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikaliet ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikelkontrolgrupper (se afsnit 17).

▼M4

Kontroldyr

17. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikaliet. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontroldyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

18. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

Partikelstørrelsesfordeling

19. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 μm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

20. Ideelt testes testkemikaliet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikaliet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

21. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan

▼M4

frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås. Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

22. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

23. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

24. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet målt ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.

25. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

▼M4

26. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret (t_{95}) og henfald. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).

27. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

28. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.

29. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.

30. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

31. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslanger på dyrene, dårligt belyste helkropskamre eller uigennemsigtige atmosfærer, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.

▼**M4**

32. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

33. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, bioovervågning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdsændringer.

KROPSVÆGT

34. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første to uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionsperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

35. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

KLINISK PATOLOGI

36. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).

37. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactat-dehydrogenase, sorbitol-dehydrogenase, glutamat-dehydrogenase og γ-glutamyltranspeptidase).

▼M4

Tabel 1

Standardparametre for klinisk patologi

Hæmatologisk undersøgelse	
Erythrocyttælling	Leukocyttal
Hæmatokrit	Differentialtælling
Hæmoglobinkoncentration	Trombocyttal
Middelcellehæmoglobin	Koaguleringsevne (vælg én):
Middelcellevolumen	— protrombintid
Middelcellehæmoglobinkoncentration	— koaguleringstid
Retikulocyttælling	— partiel tromboplastintid

Klinisk-kemisk undersøgelse	
Glukose (*)	Alanin-aminotransferase
Total kolesterol	Aspartat-aminotransferase
Triglycerider	Alkalisk fosfatase
BUN	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Protein	Fosfor
Albumin	Chlorid
Globulin	

Urinanalyse (valgfri)	
Udseende (farve og turbiditet)	Total protein
Volumen	Glukose
Specifik vægtfylde eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den være tilpasset den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde sammen med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).

38. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocyttal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indicerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylning findes i GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

39. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

40. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

Tabel 2

Organer og væv, der præserveres under makroskopisk obduktion

Binyrer	Vesiculae seminales
Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat)	Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal)
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	**Milt**
[Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg]	Mavesæk
Hjerte	**Testikler**
Nyrer	**Brisler**
Larynx (3 niveauer, 1 niveau, som omfatter basis af strubelåget)	Skjoldbruskkirtlen
Lever	Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit)
Lunge (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier)	[Urinblære]
Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtopløselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder.	Uterus
Nasopharyngeale væv (mindst niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	Alle større læsioner
Øsofagus	
[Bulbus olfactorius]	
Æggestokke	

▼M4

41. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskylning, udtages en ikkeskyllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).

42. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5, 6, 7, 8, 9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT; 10, 11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

43. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste koncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, hvor der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højeksponeringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

Data

44. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og uventede resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

Testrapport

45. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

▼M4

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

— detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— behandling af tilført/udledt luft

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata:

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

▼M4

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m^3 osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

▼M4

— opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt

— opstilling i tabelform af foderindtagelse

— opstilling i tabelform af kliniske patologiske data

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— opstilling i tabelform af eventuelle andre målte parametre.

Diskussion og fortolkning af resultater

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

— Målorganet (-organerne) identificeres.

— NOAEL og LOAEL bestemmes.

LITTERATUR:

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

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

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

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

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

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

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

(13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.9. **TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres dagligt huden i graduerede doser på grupper af forsøgsdyr, idet der anvendes en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode på 28 dage. I eksponeringspenoden observeres dyrene dagligt for symptomer på toksisk virkning. Dyr, der dør under forsøget, obduceres, og ved forsøgets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper, inden forsøget sættes i gang. Kort før forsøget indledes, klippes dyrene på ryggen. Såfremt dyrene barberes, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning og barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af kroppens overflade klargøres til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Teststoffet påføres dagligt 5-7 dage om ugen.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter, kaniner eller marsvin. Der kan også anvendes andre dyrearter, men i så fald skal det begrundes.

▼B

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst ti dyr (fem hunner og fem hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) for den højeste dosis i 28 dage og gennem en periode på 14 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe på ti kontroldyr (fem af hvert køn).

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er på mindst seks timer dagligt. Teststoffet påføres på omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (én gang eller to gange om ugen), så de er konstante i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra påføring af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis påføring af teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, sænkes koncentrationen, hvilket kan medføre, at andre toksiske virkninger på det højeste dosisniveau svækkes eller forsvinder. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afslutte forsøget og foretage et nyt forsøg med lavere koncentrationer.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Hvis der i en indledende undersøgelse med en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt eller en større dosis fastsat ud fra kendskab til den eksponering, mennesker kan blive udsat for, ikke konstateres nogen toksisk virkning, kan yderligere test betragtes som unødvendige.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Dyrene observeres dagligt for symptomer på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

▼B

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hvert sit bur. Den ideelle dosering består i påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden påføring af teststof, således at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Den daglige eksponeringsperiode er på mindst seks timer.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet skal påføres så tyndt og ensartet over en så stor del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales. Alternativt kan der benyttes en beskyttelseskrave.

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og toksicitetssymptomer registreres, herunder hvornår disse symptomer optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Dyrene vejes én gang om ugen. Det anbefales, at der også holdes regnskab med den ugentlige fødeindtagelse. Dyrene observeres med jævne mellemrum, så dyr ikke går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgrupperne. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

Ved forsøgets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelser:

1) hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling og et mål for koaguleringsevnen

2) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst en lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet for en fyldestgørende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

▼B

Der kan udføres yderligere klinisk-biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for videre undersøgelse af observerede virkninger.

1.6.4. **Makroskopisk undersøgelse**

Alle forsøgsdyrene underkastes en fuldstændig makroskopisk undersøgelse. Lever, nyrer, binyrer og testes vejes så hurtigt som muligt efter udtagningen, så udtørring undgås. Væv og organer, dvs. normal og eksponeret hud, lever, nyrer, milt, testes, binyrer, hjerte og målorganer (dvs. organer, der udviser makroskopiske læsioner eller forandringer i størrelse), opbevares i et passende medium med henblik på eventuel senere histopatologisk undersøgelse.

1.6.5. **Histopatologisk undersøgelse**

Der foretages en histologisk undersøgelse af præpareret væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har været udsat for den største dosis. Observeres der i gruppen med den højeste dosis vævs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersøges de samme væv og organer i grupperne med lavere dosis. Dyrene i satellitgruppen underkastes en histologisk undersøgelse, især de væv og organer, der udviser virkning i de øvrige grupper.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsøget, og for hver type læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser (herunder forbindingstypen: med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— nuleffektniveau, hvor det er muligt

— oplysninger om toksiske reaktioner opdelt efter køn og dosis

— angivelse af dyrenes dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— toksiske og andre virkninger

— for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling

— foder- og legemsvægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

▼B

— klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B (punkt D).

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B (punkt E).

▼M7

B.10. *IN VITRO*-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 473 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

Formålet med in vitro-testen for kromosomaberrationer er at påvise, om et kemikalie eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelser i dyrkede pattedyrceller (2) (3) (4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Polyploidi (herunder endofordobling) kan opstå i kromosomaberrationsassays in vitro. Selv om aneugener kan fremkalde polyploidi, er polyploidi alene ikke tegn på aneugenpotentiale og kan ganske enkelt være tegn på forstyrrelse eller cytotoksicitet af cellecyklussen (5). Denne test er ikke beregnet til at måle aneuploidi. En in vitro-mikrokernetest (6) anbefales til påvisning af aneuploidi.

I in vitro-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller primære cellekulturer af human oprindelse eller gnaveroprindelse. Cellerne bør udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karotypens stabilitet (herunder kromosomtal) og hyppighed af spontane kromosomaberrationer (7). På nuværende tidspunkt gør de tilgængelige data det ikke muligt at fremlægge konkrete anbefalinger, men viser, at det i forbindelse med vurdering af kemiske farer er vigtigt at tage højde for status af *p53*, genetisk (karotypens) stabilitet, DNA-reparationskapacitet og oprindelse (gnavere eller mennesker) af de celler, der er udvalgt til test. Brugerne af denne forsøgsmetode opfordres således til at overveje, hvilken indflydelse disse og andre celleegenskaber har på, hvordan en cellelinje kan afsløre induktion af kromosomafvigelser, da der hele tiden fremkommer ny viden på dette område.

De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen metabolisk aktivering, medmindre cellerne er metabolisk kompetente i forhold til testkemikalierne Metabolismeaktiveringssystemet efterligner ikke fuldstændigt in vivo-forholdene. Man bør omhyggeligt undgå betingelser, der kunne føre til et artefakt positivt resultat, dvs. kromosomskade, der ikke skyldes direkte interaktion mellem testkemikaliet og kromosomer. Disse betingelser omfatter ændringer i pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller for højt cytotoksicitetsniveau (13) (14) (15) (16).

Denne test bruges til at registrere kromosomaberrationer, som kan hidrøre fra klastogene hændelser. Analysen af induktion af kromosomaberrationer bør foretages ved hjælp af celler i metafase. Det er derfor vigtigt, at celler bør opnå mitose i både behandlede og ubehandlede kulturer. For fremstillede nanomaterialer kan der være behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men disse er ikke beskrevet i denne forsøgsmetode.

Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data til lovgivningsmæssige anvendelsesformål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

▼M7

PRINCIP FOR TESTEN

Cellekulturer fra mennesker eller andre pattedyr eksponeres for testkemikaliet både med og uden en eksogen metabolisk aktivering, medmindre der anvendes celler med en tilstrækkelig metaboliseringsevne (jf. punkt 13). Efter passende forud fastsatte tidsrum efter starten af eksponeringen for testkemikaliet behandles kulturerne med et metafasestandsende kemikalie (f.eks. colcemid eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af aberration af kromatidtypen og kromosomtypen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Celler

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer (f.eks. ovarie fra kinesisk hamster (CHO), lunge fra kinesisk hamster V79, lunge fra kinesisk hamster (CHL)/IU, TK6) eller primære cellekulturer, herunder perifere blodlymfocytter fra mennesker eller andre pattedyr (7). Valget af anvendte cellelinjer bør begrundes videnskabeligt. Når der anvendes primære celler, bør det af hensyn til dyrevelfærden overvejes at anvende primære celler fra mennesker, hvis det er muligt, og disse bør indsamles i overensstemmelse med menneskelige etiske principper og regler. Perifere blodlymfocytter fra mennesker bør udtages fra unge (ca. 18-35 år), ikkerygende personer uden kendt sygdom eller nylige eksponeringer for genotoksiske stoffer (f.eks. kemikalier, ioniserende stråling) i et niveau, der vil øge baggrundsforekomsten af kromosomaberrationer. Det vil sikre en lav og konsekvent baggrundsforekomst af kromosomaberrationer. Den grundlæggende forekomst af kromosomaberrationer stiger med alderen, og denne tendens er mere markant hos kvinder end hos mænd (17) (18). Hvis celler fra mere end en donor pooles, bør antallet af donorer angives. Det er nødvendigt at påvise, at cellerne er delt fra begyndelsen af behandlingen med testkemikaliet til prøveudtagning. Cellekulturer fastholdes i en eksponentiel cellevækstfase (cellelinjer) eller stimuleres til at dele sig (primære kulturer af lymfocytter) for at eksponere cellerne på forskellige stadier i cellecyklussen, da cellefasernes følsomhed over for testkemikalierne muligvis ikke kendes. De primære celler, der skal stimuleres med mitogenstoffer for at dele sig, synkroniseres generelt ikke længere under eksponering for testkemikaliet (f.eks. humane lymfocytter efter en 48-timers stimulering med mitogen). Det anbefales ikke at bruge synkroniserede celler under behandlingen, men det kan accepteres, såfremt det er berettiget.

Medier og dyrkningsbetingelser

Til vedligeholdelse af kulturerne bør der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsflasker, fugtig atmosfære på 5 % CO_2, hvor det er relevant, inkubationstemperatur på 37 °C). Cellelinjer bør kontrolleres regelmæssigt for et stabilt normalt kromosomtal og fravær af mykoplasmakontaminering (7) (19), og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det normale kromosomtal har ændret sig, bør cellerne ikke anvendes. Den normale cyklustid for de cellelinjer eller primære kulturer, der benyttes i laboratoriet, bør være fastlagt og være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber (20).

Fremstilling af kulturer

Cellelinjer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt, indtil de høstes (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

▼M7

Lymfocytter: Fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller frasepareredе lymfocytter dyrkes (f.eks. i 48 timer for humane lymfocytter) med tilstedeværelse af et mitogen [f.eks. phytohæmagglutinin (PHA) for humane lymfocytter] for at fremkalde celledeling inden eksponering for testkemikaliet.

Metabolisk aktivering

Eksogene metaboliserende systemer bør anvendes, når der gøres brug af celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der som standard anbefales, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra gnavere (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (21) (22) (23) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (30) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 25 til induktion af oxidaser med blandet funktion (24) (25) (26) (28). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Brug af produkter, der nedsætter mitoseindekset, især calciumkompleksdannere (31), bør undgås under behandlingen. Valget af type og koncentration af exogent metabolismeaktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af den testede kemikaliegruppe.

Præparering af testkemikaliet

Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 23). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (32) (33) (34). Der bør laves præparater af testkemikaliet lige inden behandlingen, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt.

Testbetingelser

Opløsningsmidler

Opløsningsmidlet bør vælges for at optimere testkemikaliets opløselighed uden at påvirke assayets adfærd negativt, f.eks. ved at ændre cellevækst, påvirke integriteten af testkemikaliet, reagere med dyrkningsflasker eller forringe metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er f.eks. vand eller dimethylsulfoxid. Organiske opløsningsmidler bør generelt ikke overstige 1 % (v/v), og vandige opløsningsmidler (saltvand eller vand) bør ikke overstige 10 % (v/v) i det færdige behandlingsmedium. Hvis der anvendes ikke-veletablerede opløsningsmidler (f.eks. ethanol eller acetone), bør brugen af dem underbygges med data, der viser deres kompatibilitet med testkemikalier, testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Uden disse understøttende data er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (jf. tillæg 1) for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke frembringer skadelige eller klastogene virkninger.

Måling af celleproliferation og cytotoksicitet og valg af behandlingskoncentrationer

Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør man undgå koncentrationer, der kan frembringe en artefakt positiv respons, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksicitet (jf. punkt 22), udfældning i dyrkningsmediet (jf. punkt 23) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (jf. punkt 5). Hvis

▼M7

testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-værdien justeres ved bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå et artefakt positivt resultat og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

Målinger af celleproliferation foretages for at sikre, at et passende antal af de behandlede celler har undergået mitose under testen, og at behandlingerne udføres med passende cytotoksicitet (jf. punkt 18 og 22). Cytotoksiciteten bør bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celledød og -vækst. Evaluering af cytotoksicitet i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøg, men en indledende test er ikke obligatorisk. Hvis en sådan test udføres, bør den ikke erstatte måling af cytotoksicitet i hovedforsøget.

Relativ populationsfordobling (RPD) eller relativ forøgelse af celletal (RICC) er passende metoder til vurdering af cytotoksicitet i cytogenetiske test (13) (15) (35) (36) (55) (jf. formlerne i tillæg 2). I tilfælde af langtidsbehandling og prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til 1,5 gange normal cellecykluslængde regnet fra behandlingens begyndelse (dvs. længere end 3 cellecykluslængder i alt), kan anvendelsen af RPD føre til, at cytotoksiciteten undervurderes (37). Under disse omstændigheder kan RICC være et bedre mål, eller evaluering af cytotoksicitet efter 1,5 gange normal cellecykluslængde kunne være et nyttigt estimat ved brug af RPD.

For lymfocytter i primærkulturer er mitoseindekset (MI) et mål for cytotoksisk/cytostatisk virkning, men påvirkes af, hvor længe efter behandlingen det måles, det anvendte mitogen og mulige forstyrrelser af cellecyklussen. MI er imidlertid acceptabelt, da andre cytotoksicitetsmålinger kan være både besværlige og upraktiske og ikke nødvendigvis gælder for målpopulationen af lymfocytter, der vokser som reaktion på PHA-stimulering.

Mens RICC og RPD for cellelinjer og MI for primærkulturer af lymfocytter er de anbefalede cytotoksicitetsparametre, kan andre indikatorer (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, cellecyklus) give nyttige supplerende oplysninger.

Mindst tre testkoncentrationer (herunder ikke opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (passende cytotoksicitet, antal celler mv.), bør vurderes. Uanset hvilke typer celler (cellelinjer eller primærkulturer af lymfocytter), det drejer sig om, kan der ved hver af de testede koncentrationer anvendes enten replikate eller enkelte behandlede kulturer. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, accepteres anvendelse af enkeltkulturer også, forudsat at det samme totale celleantal scores i enten enkeltkulturer eller dublikate kulturer. Brug af enkeltkulturer er især relevant ved vurdering af mere end tre koncentrationer (jf. punkt 31). De resultater, der er opnået i uafhængige replikate kulturer i en given koncentration, kan samles med henblik på dataanalyse (38). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoksicitet, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoksicitet, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra det, der frembringer cytotoksicitet som beskrevet i punkt 22, til koncentrationer, hvor der er en beskeden og ringe eller ingen cytotoksicitet. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at indhente data ved lav og moderat cytotoksicitet eller undersøge dosis/respons-forholdet nærmere vil det

▼M7

være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og/eller mere end tre koncentrationer (enkeltkulturer eller replikater), navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 47).

Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoksicitet, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå 55 ± 5 % cytotoksicitet ved hjælp af de anbefalede cytotoksicitetsparametre (dvs. reduktion af RICC og RPD for cellelinjer og reduktion af MI for primærkulturer af lymfocytter til 45 ± 5 % af den sideløbende negative kontrol). Man bør være omhyggelig med at fortolke positive resultater, der kun findes i den høje ende af dette cytotoksicitetsområde på 55 ± 5 % (13).

For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoksiske ved koncentrationer, der er lavere end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller ved hjælp af et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliet. Selv om der forekommer cytotoksicitet over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun en koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen (f.eks. farvning eller scoring). Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoksicitet, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (39) (40) (41). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) (42), miljømæssige udtræk mv., kan der være behov for at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoksicitet for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (43).

Kontroller

Der bør i hver høst indgå samtidige negative kontrolprøver (jf. punkt 15), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.

Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere klastogener i henhold til testprotokollen og effektiviteten af det exogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolkemikalier kan anvendes, hvis der er belæg for det. Fordi in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede, kan brug af positive kontroller begrænses til et klastogen, som kræver metabolisk aktivering. Forudsat at det sker samtidig med den ikke-aktiverede test med samme behandlingsvarighed, vil den positive kontrolrespons påvise både aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet og testsystemets reaktionsevne. Langtidsbehandling (uden S9) bør dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolismeaktivering. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne for at påvise testsystemets følsomhed (dvs. virkningerne er tydelige, uden at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem), og responsen bør ikke bringes i fare på grund af cytotoksicitet, der overskrider de grænser, der er fastsat i forsøgsmetoden.

▼M7

Tabel 1.

Anbefalede referencekemikalier til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller.

Kategori	Kemikalie	CAS-registrerings-nummer
1. Aktive klastogener uden metabolisk aktivering		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-Oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener, som kræver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclofosfamid	50-18-0

FREMGANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

Celler under formering behandles med testkemikaliet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem.

Høst af kulturer

For at opnå en grundig evaluering, hvilket er en forudsætning for at kunne konkludere, at resultatet er negativt, bør alle tre følgende forsøgsbetingelser udføres med en kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering og langtidsbehandling uden metabolisk aktivering (jf. punkt 43, 44 og 45):

— Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages en prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (18).

— Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet med metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages en prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (18).

— Celler bør kontinuerligt eksponeres uden metabolisk aktivering indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange normal cellecykluslængde. Nogle kemikalier (f.eks. nukleosidanaloger) er lettere at bestemme ved behandlings-/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange cellecykluslængden (24).

I tilfælde af, at en af ovenstående forsøgsbetingelser fører til et positivt svar, er det muligvis ikke nødvendigt at undersøge nogen af de andre behandlinger.

Præparering af kromosomer

Cellekulturerne behandles med colcemid eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og

▼M7

farvning (1). I encellede lag kan der være mitotiske celler (runde celler, der er løsrevet fra overfladen) til stede efter eksponeringen på 3-6 timer. Da disse mitotiske celler let løsrives, kan de gå tabt, når mediet med testkemikaliet fjernes. Hvis der er grund til at tro, at der sker en betydelig stigning i antallet af mitotiske celler i forhold til kontrollerne, hvilket er tegn på sandsynlig mitosestandsning, bør cellerne indsamles ved centrifugering og gentilsættes kulturerne for ikke at miste celler, der er i mitose, og hvor der er risiko for kromosomaberration på høsttidspunktet.

Analyse

Alle objektglas, herunder fra positive og negative kontrolprøver, bør kodes uafhængigt inden mikroskopering for kromosomaberrationer. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2.

Mindst 300 velpræparerede metafaser bør scores pr. koncentration og kontrol, for at det kan konkluderes, at et testkemikalie er klart negativt (jf. punkt 45). De 300 celler bør fordeles ligeligt mellem replikaterne, når der benyttes replikate kulturer. Benyttes enkeltkulturer pr. koncentration (jf. punkt 21), bør mindst 300 velpræparerede metafaser scores i denne enkeltkultur. Scoring af 300 celler har den fordel, at testens statistiske power øges, og desuden ses nulværdier sjældent (forventes at være blot 5 %) (44). Antallet af bedømte metafaser kan reduceres, hvis der observeres store mængder celler med kromosomaberrationer, og testkemikaliet anses for at være tydeligt positivt.

Celler med strukturelle kromosomaberrationer med og uden gaps bør scores. Brud og gaps er defineret i tillæg 1 i henhold til (45) (46). Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere og eventuelt underkastes peer review.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere frekvensen af polyploidi og endofordobling, hvis dette konstateres (jf. pkt. 2).

Laboratoriets kompetencer

For at få tilstrækkelig erfaring med testen, før den tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer, og forskellige negative kontroller (ved hjælp af forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har opsamlet erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 37.

Et udvalg af positive kontrolkemikalier (jf. tabel 1 i punkt 26) bør undersøges med korte og lange behandlinger uden metabolismeaktivering samt med kort behandling med metabolismeaktivering med henblik på at kunne påvise evnen til at spore klastogene kemikalier og vurdere effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte kemikalier, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

▼M7

Historiske kontroldata

Laboratoriet bør fastlægge:

— et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling

— et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere eksperimentelle data til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (44) (47). Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men fortrinsvis bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (48)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er »under kontrol« i deres laboratorium (44). Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (47).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

Negative kontroldata bør bestå af forekomsten af celler med kromosomaberrationer fra en enkeltkultur eller summen af replikate kulturer som beskrevet i punkt 21. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase (44) (47). Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er »under kontrol« (jf. punkt 37) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

Den procentdel af cellerne, som har en eller flere strukturelle kromosomaberrationer, bør vurderes. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen klassificeret ved undertyper (brud, udvekslinger) bør anføres særskilt med antal og hyppighed for forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps registreres og oplyses særskilt, men medregnes ikke i den totale aberrationshyppighed. Procentdelen af polyploidi og/eller endofordoblede celler rapporteres, når den ses.

Sideløbende målinger af cytotoksicitet for alle behandlede, negative og positive kontrolkulturer i hovedforsøget bør ligeledes registreres.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

— Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase som beskrevet i punkt 39.

▼M7

— Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 26) bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Celleproliferationskriterier i opløsningsmiddelkontrollen bør være opfyldt (punkt 17 og 18).

— Alle tre forsøgsbetingelser blev testet, medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 28).

— Tilstrækkeligt antal analyserbare celler og koncentrationer (punkt 31 og 21).

— Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 22, 23 og 24.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt i en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 28):

a) Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b) Stigningen er dosisafhængig, når den evalueres med en passende trend test.

c) Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 39).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliet for at kunne fremkalde kromosomaberrationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (49) (50) (51).

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt i alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 28):

a) Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b) Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend test.

c) Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 39).

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde kromosomaberrationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv som beskrevet ovenfor eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Scoring af yderligere celler (hvor det er relevant) eller et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) kan være nyttigt.

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er tvetydig.

▼M7

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkalde kromosomantalsaberrationer (52). En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at testkemikaliet kan inhibere cellecyklussens forløb (53) (54) (jf. punkt 2). Forekomsten af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer bør derfor registreres særskilt.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis dette er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, hvortil kemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— procentdelen af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium bør også angives.

Celler:

— celletype og oprindelse

— den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed

— fravær af mycoplasma for cellelinjer

— for cellelinjer, oplysninger om cellecyklussens længde, fordoblingstid eller proliferationsindeks

— bloddonorers køn, alder og andre relevante oplysninger om donor, fuldblod eller fraseparerede lymfocytter, benyttet mitogen

— eventuelt antal passager for cellelinjer

— eventuelle metoder til opbevaring af cellekulturer for cellelinjer

— normalt kromosomtal for cellelinjer.

▼**M7**

Testbetingelser:

— det metafasestandsende kemikalies betegnelse og koncentration og varigheden af cellernes eksponering for stoffet

— testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. μg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel CO_2-koncentration, fugtighedsniveau

— koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet

— inkubationstemperatur

— inkubationstid

— behandlingens varighed

— høsttidspunkt efter behandling

— celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde for S9, metode til fremstilling af S9-sammensætning, koncentration eller rumfang af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)

— positive og negative kontrolkemikalier, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse

— anvendte metoder til præparering af objektglas og farvningsteknik

— kriterier for accept af assays

— kriterier for scoring af aberrationer

— antal analyserede metafaser

— metoder til måling af cytotoksicitet

— eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoksicitet og anvendt metode

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

— anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

— antal behandlede celler og antal høstede celler for hver kultur, når der benyttes cellelinjer

— cytotoksicitetsmålinger, f.eks. RPD, RICC, MI og eventuelt andre observationer

— oplysninger om cellecyklussens længde, fordoblingstid eller proliferationsindeks for cellelinjer

— tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse

▼M7

— definitioner af aberrationer, herunder gaps

— antal scorede celler, antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur med og uden gaps

— eventuelt observerede ploidiændringer (polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer, anført særskilt)

— koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt

— sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontrolprøver (koncentrationer og opløsningsmidler)

— historisk negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt mængden af data

— statistiske analyser og eventuelle P-værdier.

Diskussion af resultater

Konklusioner

LITTERATUR

(1) OECD, »Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment. Under preparation.

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

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

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

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

(6) Kapitel B.49 i dette bilag: *In vitro-mikrokernetest i pattedyrceller*.

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

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

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

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

▼**M7**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

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

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

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

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgængelig på: http://www.pops.int/.

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

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

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

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

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

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

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

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. I: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Tilgængelig på anmodning.

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

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

▼**M7**

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

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

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

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

(46) Scott, D. *et al*. (1990), »Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*«, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

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

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

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

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

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), »Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays«, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

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

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

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

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

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Apoptose: Programmeret celledød karakteriseret ved en række trin, der forårsager opløsning af celler i membranbundne partikler, som herefter elimineres ved fagocytose eller afstødning.

Celleproliferation: Forøgelse af celleantal som følge af mitotisk celledeling.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Kromatidbrud: Diskontinuitet i et enkelt kromatid, hvor der er en tydelig forskydning af en af kromatiderne.

Kromatidgap: Region uden farvning (akromatisk læsion) af et enkeltkromatid, hvor der er minimal forskydning af kromatidet.

Aberration af kromatidtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Klastogen: Alle stoffer eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Koncentrationer: Henviser til endelige koncentrationer af testkemikaliet i dyrkningsmediet.

Cytotoksicitet: For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode ved hjælp af cellelinjer, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i den relative populationsfordobling (RPD) eller den relative forøgelse af celletal (RICC) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og tillæg 2). For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode ved hjælp af primære kulturer af lymfocytter, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i mitoseindekset (MI) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 18 og tillæg 2).

Endofordobling: En proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Genotoksisk: Et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejringer, genmutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitoseindeks (MI): Forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; viser populationens formeringsgrad.

Mitose: Deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mutagen: Forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

▼M7

Antalsaberration: Ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: Antalsmæssige kromosomaberrationer i celler eller organismer, der involverer et eller flere komplette kromosomsæt, men ikke et enkelt kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

p53-status: p53-protein indgår i cellecyklusregulering, apoptose og DNA-reparation. Celler, der mangler funktionelt p53-protein, og som ikke kan standse cellecyklussen eller eliminere beskadigede celler via apoptose eller andre mekanismer (f.eks. induktion af DNA-reparation), som vedrører p53-funktioner som reaktion på DNA-beskadigelse, bør teoretisk set være mere modtagelige for genmutationer eller kromosomaberrationer.

Relativ forøgelse af celletal (RICC): Forøgelse af celletallet i kemisk eksponerede kulturer i forhold til forøgelsen i ubehandlede kulturer udtrykt i procent.

Relativ populationsfordobling (RICC): Forøgelse af antallet af populationsfordoblinger i kemisk eksponerede kulturer i forhold til forøgelsen i ubehandlede kulturer udtrykt i procent.

S9-leverfraktion: Supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: Blanding af S9-leverfraktionen og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Opløsningsmiddelkontrol: Generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Strukturel ændring: Ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Ubehandlede kontroller: Kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

▼M7

Tillæg 2

FORMLER FOR VURDERING AF CYTOTOKSICITET

Mitoseindeks (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Number of mitotic cells}}{\text{Total number of Cells scored}} \times 100$$

Relativ forøgelse af celletal (RICC) eller **relativ populationsfordobling (RPD)** anbefales, da der ved begge metoder tages højde for den andel af cellepopulationen, som har delt sig.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{No.of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No.of population doublings in control cultures})} \times 100$$

hvor:

Populationsfordobling = [log (celleantal efter behandling ÷ oprindeligt celleantal)] ÷ log 2

En RICC eller RPD på 53 % viser f.eks. 47 % cytotoksicitet/cytostase, og 55 % cytotoksicitet/cytostase målt ved MI betyder, at det faktiske MI er 45 % af kontrollen.

Under alle omstændigheder bør antallet af celler inden behandling måles, og det samme gør sig gældende for behandlede og negative kontrolkulturer.

Selv om RCC (dvs. antal celler i behandlede kulturer/antal celler i kontrolkulturer) tidligere er blevet brugt som cytotoksicitetsparameter, anbefales dette ikke længere, da cytotoksiciteten kan undervurderes.

I de negative kontrolkulturer bør populationsfordobling være kompatibel med kravet om at tage prøver af celler efter behandlingen på et tidspunkt svarende til ca. 1,5 gange længden af den normale cellecyklus, og mitoseindekset bør være højt nok til at få et tilstrækkeligt antal celler i mitose og til at kunne beregne en reduktion på 50 % pålideligt.

▼M7

B.11. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 475 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

In vivo-testen for kromosomaberrationer i knoglemarv hos pattedyr er navnlig relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responserne, selv om de kan være forskellige fra art til art. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der er påvist ved en in vitro-test.

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et testkemikalie forårsager strukturelle kromosomafvigelser i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (2) (3) (4) (5). Der er to typer aberrationer af kromosomstrukturen, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste genotoksiske aberrationer er af kromatidtypen, men også aberrationer af kromosomtypen forekommer. Beskadigelse af kromosomer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at disse læsioner og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker til induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemet. Polyploidi (herunder endofordobling) kan opstå i kromosomaberrationsassays in vivo. En stigning i polyploidi alene er imidlertid ikke tegn på aneugenpotentiale og kan ganske enkelt være tegn på forstyrrelse eller cytotoksicitet af cellecyklussen. Denne test er ikke beregnet til at måle aneuploidi. En in vivo-test for mikrokerner i erythrocytter hos pattedyr (kapitel B.12 i dette bilag) eller en in vitro-test for mikrokerner i celler hos pattedyr (kapitel B.49 i dette bilag) vil være henholdsvis den in vivo- og in vitro-test, som anbefales til påvisning af aneuploidi.

Definitioner af den anvendte terminologi findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Der anvendes rutinemæssigt gnavere i denne test, men andre arter kan i visse tilfælde være hensigtsmæssige, såfremt det er videnskabeligt begrundet. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation, der består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Den videnskabelige begrundelse for at bruge andre arter end rotter og mus bør anføres i rapporten. Hvis der anvendes andre arter end gnavere, anbefales det at integrere målingen af kromosomaberrationer i knoglemarv i en anden passende toksicitetstest.

Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

▼M7

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

Dyrene eksponeres for testkemikaliet på passende vis og aflives humant et passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller colcemid). Der fremstilles derefter præparater af knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Kompetenceundersøgelser

For at få tilstrækkelig erfaring med udførelsen af assayet, inden det anvendes til rutinetest, bør laboratoriet have påvist, at det kan frembringe de forventede resultater ud fra de offentliggjorte data (f.eks. (6)) for hyppigheden af kromosomaberrationer med mindst to positive kontrolkemikalier (herunder svag respons fremkaldt af lave doser af positive kontroller) som dem, der er anført i tabel 1, og med kompatible bærestof-/opløsningsmiddelkontroller (jf. punkt 22). Til disse forsøg bør der anvendes doser, der giver reproducerbare og dosisrelaterede stigninger og påviser testsystemets følsomhed og dynamiske interval i det relevante væv (knoglemarv) ved hjælp af den scoringsmetode, som skal anvendes i laboratoriet. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 10-14.

Historiske kontroldata

I løbet af kompetenceundersøgelserne bør laboratoriet fastlægge:

— et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling og

— et historisk negativt kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til den historiske kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling. Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør være så statistisk robust, at laboratoriet kan vurdere fordelingen af deres negative kontroldata. Ifølge litteraturen kan det være nødvendigt at foretage mindst 10 forsøg, men det foretrækkes at foretage mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (7)) til at identificere, hvor variable deres kontroldata er, samt vise, at metodologien er »under kontrol« i deres laboratorium. Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (8).

Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust negativ kontrolfordeling (jf. punkt 11) under kompetenceundersøgelserne (beskrevet i punkt 9), kan det accepteres at opbygge fordelingen under de første rutinetest. Denne fremgangsmåde bør følge anbefalingerne i litteraturen (8), og de negative kontrolresultater, der opnås i disse forsøg, bør stemme overens med de offentliggjorte negative kontroldata.

▼M7

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de påvirker resultaterne på en måde, der stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Kun store uoverensstemmelser bør føre til, at der etableres en ny historisk kontroldatabase, hvor eksperter vurderer, at den adskiller sig fra den tidligere fordeling (jf. punkt 11). Under genetableringen er der muligvis ikke behov for en fuldstændig negativ kontroldatabase for at give mulighed for at foretage en faktisk test, hvis laboratoriet kan påvise, at deres sideløbende negative kontrolværdier forbliver enten forenelige med deres tidligere database eller med de tilsvarende offentliggjorte data.

Negative kontroldata bør bestå af forekomsten af aberrationer i kromosomernes struktur (dog ikke gaps) hos hvert enkelt dyr. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er »under kontrol« (jf. punkt 11) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der bør anvendes raske unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der anvendes sædvanligvis rotter, men mus kan også anvendes. En hvilken som helst anden pattedyrsart kan anvendes, hvis dette begrundes videnskabeligt i rapporten.

Miljø og fodringsbetingelser

Temperaturen i dyrerummet bør for gnavere være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højst fem dyr pr. bur) af samme køn og behandlingsgruppe, såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

Der anvendes normalt sunde unge voksne dyr (for gnavere ideelt set 6-10 uger gamle ved behandlingens start, selv om lidt ældre dyr også accepteres), som fordeles tilfældigt i kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres unikt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og akklimatiseres til laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Krydskontaminering af den positive kontrol og testkemikaliet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes føde eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende

▼M7

aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltvand, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. I fravær af historiske eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer strukturelle aberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastlægge, om opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen kan accepteres.

Kontroller

Positive kontroller

Hver test bør normalt omfatte en gruppe dyr, der behandles med et positivt kontrolkemikalie. Dette krav kan fraviges, hvis testlaboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og har fastlagt et historisk positivt kontrolområde. Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede objektglas). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrolforsøg (f.eks. hver 6.-18. måned) i det laboratorium, hvor testen udføres, f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

Positive kontrolkemikalier bør frembringe en påviselig forøgelse af celler med strukturelle kromosomaberrationer over det spontane niveau. Der bør vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol administreres på anden vis end testkemikaliet ved hjælp af et andet behandlingsprogram, eller at prøveudtagningen kun forekommer på et bestemt tidspunkt. Hvis det er hensigtsmæssigt, bør der anvendes kemisk beslægtede positive kontrolkemikalier. Eksempler på positive kontrolkemikalier findes i tabel 1.

Tabel 1

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolkemikalier

Kemikalie	CAS-registreringsnummer
Ethylmethansulfonat	62-50-0
Methylmethansulfonat	66-27-3
Ethylnitrosourinstof	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 (6055-19-2)
Triethylenmelamin	51-18-3

▼M7

Negative kontroller

Dyr i den negative kontrolgruppe bør inkluderes på alle prøveudtagningstidspunkter og ellers håndteres på samme måde som behandlingsgrupperne, bortset fra at de ikke behandles med testkemikaliet. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel/bærestof til administrering af testkemikaliet, bør kontrolgruppen modtage dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis der imidlertid konstant påvises forskelle mellem dyrene og hyppige forekomster af celler med strukturelle aberrationer i de historiske negative kontroldata på alle prøveudtagningstidspunkter for testlaboratoriet, er det muligvis kun nødvendigt med en enkelt prøveudtagning til den negative kontrol. Såfremt der bruges en enkelt prøveudtagning til negative kontroller, bør det være det første prøveudtagningstidspunkt, der anvendes i undersøgelsen.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Generelt er mikrokerneresponsen ens mellem han- og hundyr (9), og dette ventes også at være tilfældet for strukturelle kromosomaberrationer. De fleste undersøgelser kan derfor udføres hos begge køn. Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f.eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed, knoglemarvstoksicitet mv., herunder en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe. Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse af knoglemarv med to prøveudtagningstidspunkter og tre dosisgrupper og en sideløbende negativ kontrolgruppe samt en positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn) typisk højst kræve 45 dyr.

Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (10). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højst tolererede dosis (MTD) defineret som den højeste dosis, som tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet i forhold til varigheden af undersøgelsesperioden (f.eks. ved at fremkalde et fald i kropsvægt eller cytotoksicitet i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (11).

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven.

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, der kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang behandling, kan være undtagelser fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke højere end 4. Hvis testkemikaliet ikke frembringer toksicitet i en

▼M7

forprøve eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliet imidlertid frembringer toksicitet, bør MTD være den højeste administrerede dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvist dække et interval fra maksimum til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere.

Grænsetest

Hvis dosisforprøver eller eksisterende data fra beslægtede dyrestammer viser, at en behandling med som minimum grænsedosen (beskrevet nedenfor) ikke frembringer observerbare toksiske virkninger (herunder ingen formindskelse af knoglemarvsproliferation eller andre tegn på målvævets cytotoksicitet), og hvis der ikke forventes genotoksicitet baseret på in vitro-genotoksicitetsundersøgelser eller data fra strukturelt beslægtede kemikalier, er det ikke nødvendigt med en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer, forudsat at det er påvist, at testkemikaliet når målvævet (knoglemarven). I så fald kan det være tilstrækkeligt med et enkeltdosisniveau ved grænsedosis. For en indgivelsesperiode på > 14 dage er grænsedosis 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgivelsesperioder på 14 dage eller derunder er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand, topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales generelt ikke, eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering og kun bør anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikaliet iblandes føde eller drikkevand, navnlig med hensyn til enkeltdosering, bør det sikres, at tidsforskellen mellem indtagelse af føde og drikkevand og prøveudtagning er tilstrækkelig stor til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 33-34). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder bør begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende testkemikalier, som normalt vil frembringe kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testmængden variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Behandlingsplan

Testkemikalier indgives normalt som en enkelt behandling, men kan indgives som to deldoser (dvs. to eller flere behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval), hvorved det bliver lettere at indgive en større mængde. Under disse omstændigheder, eller når kemikaliet indgives ved inhalation, bør prøveudtagningstidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den seneste indgivelse eller ved slutningen af eksponeringen.

Der findes kun begrænsede data om, hvorvidt en protokol med gentagne doser er egnet til denne test. I de tilfælde, hvor det er ønskeligt at integrere denne test med en toksicitetstest med gentagne doser, bør det imidlertid sikres, at mitotiske celler med kromosomskader ikke går tabt, sådan som det kan forekomme med toksiske doser. En sådan integration kan accepteres, når den højeste dosis er

▼M7

større end eller svarer til grænsedosis (jf. punkt 29), og en dosisgruppe indgives grænsedosis under hele behandlingsperioden. Mikrokernetesten (forsøgsmetode B.12) bør ses som den valgte in vivo-test for kromosomaberrationer, når der ønskes integration med andre undersøgelser.

Der udtages knoglemarvsprøver på to tidspunkter efter enkeltbehandling. For gnavere bør det første prøveudtagningsinterval være den tid, som er nødvendig til at gennemføre 1,5 normal cellecykluslængde (idet sidstnævnte normalt følger 12-18 timer efter behandlingsperioden). Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af testkemikaliet, og af testkemikaliets indvirkning på cellecyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Ved første prøveudtagning bør alle dosisgrupper behandles, og der bør udtages prøver med henblik på analyse. Ved de(n) senere prøveudtagning(er) er det imidlertid kun den højeste dosis, som skal indgives. Indgives stoffet over mere end en dag baseret på en saglig begrundelse, bør der generelt blot udtages en prøve, når der er gået 1,5 normal cellecykluslængde efter den sidste behandling.

Efter behandlingen og inden prøveudtagningen injiceres dyrene intraperitonealt med en passende dosis af et metafasestandsende stof (f.eks. colcemid eller colchicin), og efter et passende interval udtages der derefter prøver. For mus er dette interval ca. 3-5 timer inden prøveudtagningen, og for rotter er det 2-5 timer. Cellerne høstes fra knoglemarven, lades svulme op, fikseres og farves og analyseres for kromosomaberrationer (12).

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagen dosering og ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives humant før testperiodens udløb (11).

Eksponering af målvæv

Der bør på passende tidspunkt(er) tages en blodprøve for at gøre det muligt at undersøge plasmaniveauet i testkemikaliet med henblik på at påvise, at der er sket eksponering af knoglemarven, hvor der er grundlag for dette, og hvor der ikke findes andre eksponeringsdata (jf. punkt 44).

Knoglemarvs- og kromosompræparater

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarvsceller fra dyrets lårben og skinneben, og disse eksponeres for hypotonisk væske og fikseres. Metafasecellerne udstryges derefter på objektglas og farves ved hjælp af etablerede metoder (jf. (3) (12)).

▼M7

Analyse

Alle objektglas, herunder fra positive og negative kontroller, bør kodes selvstændigt inden analyse og randomiseres, så bedømmeren ikke er bekendt med eksponeringsbetingelserne.

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoksiciteten i mindst 1 000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr), ubehandlede eller bærestof-/opløsningsmiddelnegative kontroldyr.

For hvert dyr bør der analyseres mindst 200 metafaser for strukturelle kromosomaberrationer med og uden gaps (6). Hvis den historiske negative kontroldatabase imidlertid viser, at den gennemsnitlige baggrundsfrekvens for strukturel kromosomaberration er < 1 % i testlaboratoriet, bør det overvejes at score flere celler. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere og eventuelt underkastes peer review. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne dermed går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer på mindst 2n ± 2, hvor *n* er habloidtallet for kromosomer af den pågældende art.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. For hvert dyr registreres mitoseindekset, antallet af scorede metafaseceller, antallet af aberrationer pr. metafasecelle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer bør anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Forekomsten af gaps samt polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer registreres særskilt. Frekvensen for gaps anføres, men medtages generelt ikke i den samlede frekvens for strukturel aberration. Hvis der ikke er tegn på forskellig respons hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse. Data om dyretoksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Følgende kriterier bestemmer, om testen kan accepteres:

a) De sideløbende negative kontroldata anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase (jf. punkt 11-14).

b) Sideløbende positive kontroller eller scoringskontroller bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 20-21).

c) Der er analyseret et passende antal doser og celler.

d) Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 25-28.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

▼M7

a) Mindst en af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer (uden gaps) sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b) Denne stigning er dosisafhængig på mindst et prøveudtagningstidspunkt, når den evalueres med en passende trend test.

c) Et hvilken som helst af disse resultater ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

Hvis det kun er den højeste dosis, der undersøges på et bestemt prøveudtagningstidspunkt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis der er en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol, og resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %). Anbefalinger til hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (13). Ved en dosis/respons-analyse bør mindst tre behandlede dosisgrupper analyseres. I de statistiske test bør dyret anvendes som forsøgsenhed. Positive resultater i testen for kromosomaberrationer viser, at testkemikaliet fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i den testede arts knoglemarv.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt i alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

a) Ingen af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer (uden gaps) sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b) Der er ingen dosisrelateret stigning på noget prøveudtagningstidspunkt, når dette vurderes i en egnet trend test.

c) Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

d) Knoglemarven blev eksponeret for testkemikaliet.

Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (13). Dokumentation for knoglemarvens eksponering for et testkemikalie kan omfatte et fald i mitoseindekset eller måling af plasma eller blodniveauer for testkemikaliet eller testkemikalierne. I tilfælde af intravenøs indgivelse er der ikke behov for dokumentation for eksponering. Alternativt kan der anvendes ADME-data indsamlet i en uafhængig undersøgelse under anvendelse af den samme metode og de samme arter til påvise knoglemarvseksponering. Negative resultater viser, at testkemikaliet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i den testede arts knoglemarv.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser af de afsluttede forsøg. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at analysere flere celler eller foretage en ny undersøgelse under anvendelse af modificerede forsøgsbetingelser.

▼M7

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om testkemikaliet fremkalder enten positive eller negative resultater, og konklusionen er derfor, at undersøgelsen er tvetydig.

Hyppigheden af polyploide og endofordoblede metafaser blandt de samlede metafaser bør registreres særskilt. En forøgelse af antallet af polyploide/endofordoblede celler kan være tegn på, at testkemikaliet kan inhibere mitotiske processer eller cellecyklussens forløb (jf. punkt 3).

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

— begrundelse for valg af bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

— fastlæggelse af sammensætning af føde, drikkevand eller inhalationsformulering

— analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer), når de foretages.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— dyrenes antal, alder og køn

— kilde, miljøbetingelser, føde mv.

— metode til entydig identifikation af dyr

— for korttidsundersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning; for undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

▼**M7**

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om præparering af testkemikaliet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— begrundelse for indgivelsesvej og -varighed

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet eller testkemikalierne er nået frem til det almindelige kredsløb eller knoglemarven

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant

— oplysninger om foder og vandkvalitet

— aflivningsmetode

— analgesimetode (hvis anvendt)

— detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg

— metoder til præparering af objektglas

— metoder til måling af toksicitet

— det metafasestandsende kemikalies identitet, koncentration, dosis og tidspunkt for indgivelse før prøveudtagning

— procedurer for isolering og bevaring af prøver

— kriterier for scoring af aberrationer

— antal analyserede metafaseceller pr. dyr og antal analyserede celler med henblik på mitoseindeksbestemmelse

— kriterier for accept af undersøgelsen

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker.

Resultater:

— dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— mitoseindeks, anført særskilt for hvert dyr

— antal aberrationer og aberrationsceller og type, anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— eventuelt observerede ploidiændringer, herunder frekvenser for polyploide og/eller endofordoblede celler

▼M7

— dosis/respons-forhold, hvor muligt

— statistiske analyser og anvendt metode

— data for, at eksponering af knoglemarven fandt sted

— sideløbende negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— historisk negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt tidsperiode og antal observationer

— opfyldte kriterier for en positiv eller negativ respons.

Diskussion af resultater.

Konklusion.

Referencer.

LITTERATUR

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

(2) Adler, I.D. (1984), »Cytogenetic Tests in Mammals«, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

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

(4) Richold, M. *et al*. (1990), »In Vivo Cytogenetics Assays«, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

(11) OECD (2000), »Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

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

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

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (jf. polyploidi)

Centromer: Region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Aberration af kromatidtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: En proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: En kromatisk beskadigelse, som er mindre end bredden af et kromatid, og hvor forskydningen af kromatiderne er minimal.

Mitoseindeks: Forholdet mellem antallet af celler i mitose og det samlede antal celler i en population, som er et mål for cellepopulationens spredning.

Antalsaberration: Ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal (aneuploidi).

Polyploidi: Antalsmæssige kromosomaberrationer, der indebærer en ændring i antallet af det samlede kromosomsæt, i modsætning til en antalsmæssig ændring i en del af kromosomsættet (jf. aneuploidi).

Strukturel kromosomaberration: Ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

▼M7

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-KROMOSOMABERRATIONASSAYET

Faktormodellen og dens analyse

I denne model testes mindst fem hanner og fem hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ([1]). Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også inddeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponserne er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved Design of Experiment-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

([1]) Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

▼**M7**

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

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

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

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

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

Winer, B.J. (1997). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

▼M7

B.12. TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 474 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr er navnlig relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responserne, selv om de kan være forskellige fra art til art. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der er påvist ved en in vitro-test.

En in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr anvendes til at påvise beskadigelse af kromosomerne eller mitoseapparatet hos erythroblaster forårsaget af testkemikaliet. Testen vurderer dannelsen af mikrokerner i de udtagne erythrocytter, enten i knoglemarven eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise kemikalier, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende enten tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en umoden erythrocyt (kaldes til tider også polykromatisk erythrocyt eller reticulocyt), udstødes cellens hovedkerne, og en eventuel dannet mikrokerne kan blive tilbage i cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige eller påviselige, da de ikke har en hovedkerne. Forøget forekomst af umodne erythrocytter med mikrokerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer.

Nydannede erythrocytter med mikrokerne identificeres og kvantificeres ved farvning efterfulgt af enten visuel scoring ved hjælp af et mikroskop eller automatiseret analyse. Optælling af et tilstrækkeligt antal umodne erythrocytter i perifert blod eller knoglemarv fra voksne dyr lettes betydeligt ved hjælp af en automatisk scoringsplatform. Sådanne platforme er acceptable som alternativer til manuel bedømmelse (2). Sammenlignende undersøgelser har vist, at sådanne metoder, ved hjælp af passende kalibreringsstandarder, kan give bedre reproducerbarhed i og mellem laboratorier og bedre følsomhed end manuel mikroskopisk bedømmelse (3) (4). Automatiske systemer, som kan måle frekvensen af erythrocytter med mikrokerner, omfatter, men er ikke begrænset til, flowcytometre (5), billedanalyseplatforme (6) (7) og laserscanningcytometre (8).

Selv om det ikke normalt sker som en del af testen, kan kromosomfragmenter skelnes fra hele kromosomer ved en række kriterier, bl.a. om der er en kinetokor eller DNA-centromer til stede, hvilket er tegn på intakte kromosomer. Hvis der ikke er en kinetokor eller DNA-centromer til stede, indeholder mikrokernen kun fragmenter af kromosomer, mens tilstedeværende DNA-centromer indikerer kromosomtab.

Definitioner af den anvendte terminologi findes i tillæg 1.

▼M7

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Knoglemarven hos unge voksne gnavere er målvævet for genetiske skader i denne test, idet erythrocytter produceres i dette væv. Måling af mikrokerner hos umodne erythrocytter i perifert blod er acceptabel hos andre pattedyr, hvor der er påvist tilstrækkelig følsomhed for påvisning af kemikalier, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer i disse celler (ved induktion af mikrokerner i umodne erythrocytter), og hvor der foreligger en videnskabelig begrundelse. Det vigtigste endepunkt er hyppigheden af umodne erythrocytter med mikrokerner. Hyppigheden af modne erythrocytter med mikrokerner i det perifere blod kan også benyttes som et endepunkt hos arter uden stærk splenisk udvælgelse i forhold til celler med mikrokerner, og når dyrene behandles kontinuerligt i en periode på over levetiden for erythrocytter i de arter, der anvendes (f.eks. fire uger eller mere hos mus).

Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

Dyrene eksponeres for testkemikaliet på passende vis. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene humant på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater, som farves (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles præparater, som farves (12) (16) (17) (18). Når behandlingen administreres akut, er det vigtigt at vælge tidspunkter for høst af knoglemarv eller blod, hvor der kan påvises behandlingsrelateret induktion af umodne erythrocytter med mikrokerner. I tilfælde af udtagning af perifert blod, skal der være gået tilstrækkelig lang tid til, at dette kan påvises i cirkulerende blod. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner, enten ved visualisering ved hjælp af et mikroskop, billedanalyse, flowcytometri eller laserscanningcytometri.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Kompetenceundersøgelser

Med henblik på at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige erfaringer med gennemførelse af assayet, før det tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have dokumenteret, at det er i stand til at reproducere forventede resultater ud fra offentliggjorte data (17) (19) (20) (21) (22) for frekvenser for mikrokerner med mindst to positive kontrolkemikalier (herunder svage responser induceret ved lave doser af positive kontroller), såsom dem, der er anført i tabel 1, og med kompatible bærestof-/opløsningsmiddelkontroller (jf. punkt 26). Til disse forsøg bør der anvendes doser, der giver reproducerbare og dosisrelaterede stigninger og påviser testsystemets følsomhed og dynamiske interval i det relevante væv (knoglemarv eller perifert blod) og ved hjælp af den scoringsmetode, som skal anvendes i laboratoriet. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 14-18.

Historiske kontroldata

I løbet af kompetenceundersøgelserne bør laboratoriet fastlægge:

— et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling og

▼M7

— et historisk negativt kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til den historiske kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling. Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør være så statistisk robust, at laboratoriet kan vurdere fordelingen af deres negative kontroldata. Ifølge litteraturen kan det være nødvendigt at foretage mindst 10 forsøg, men det foretrækkes at foretage mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (23)) til at identificere, hvor variable deres kontroldata er, samt vise, at metodologien er »under kontrol« i deres laboratorium. Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (24).

Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust negativ kontrolfordeling (jf. punkt 15) under kompetenceundersøgelserne (beskrevet i punkt 13), kan det accepteres at opbygge fordelingen under de første rutinetest. Denne fremgangsmåde bør følge anbefalingerne i litteraturen (24), og de negative kontrolresultater, der opnås i disse forsøg, bør stemme overens med de offentliggjorte negative kontroldata.

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de påvirker resultaterne på en måde, der stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Kun store uoverensstemmelser bør føre til, at der etableres en ny historisk kontroldatabase, hvor eksperter vurderer, at den adskiller sig fra den tidligere fordeling (jf. punkt 15). Under genetableringen er der muligvis ikke behov for en fuldstændig negativ kontroldatabase for at give mulighed for at foretage en faktisk test, hvis laboratoriet kan påvise, at deres sideløbende negative kontrolværdier forbliver enten forenelige med deres tidligere database eller med de tilsvarende offentliggjorte data.

Negative kontroldata bør bestå af forekomst af mikrokerner i umodne erythrocytter hos hvert dyr. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er »under kontrol« (jf. punkt 15) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der bør anvendes raske unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Mus, rotter eller andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Hvis der benyttes perifert blod, skal det fastslås, at splenisk fjernelse af celler med mikrokerner fra kredsløbet ikke gør det sværere at påvise inducerede mikrokerner hos udvalgte arter. Dette er klart blevet påvist for perifert blod hos mus og rotter (2).

▼M7

Den videnskabelige begrundelse for at bruge andre arter end rotter og mus bør anføres i rapporten. Hvis der anvendes andre arter end gnavere, anbefales det at integrere målingen af inducerede mikrokerner i en anden passende toksicitetstest.

Miljø og fodringsbetingelser

Temperaturen i dyrerummet bør for gnavere være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højst fem dyr pr. bur) af samme køn og behandlingsgruppe, såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

Der anvendes normalt sunde unge voksne dyr (for gnavere ideelt set 6-10 uger gamle ved behandlingens start, selv om lidt ældre dyr også accepteres), som fordeles tilfældigt i kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres unikt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og akklimatiseres til laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Krydskontaminering af den positive kontrol og testkemikaliet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes føde eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke kunne reagere kemisk med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltvand, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. I fravær af historiske eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer mikrokerner og andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastlægge, om opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen kan accepteres.

▼M7

Kontroller

Positive kontroller

Hver test bør normalt omfatte en gruppe dyr, der behandles med et positivt kontrolkemikalie. Dette krav kan fraviges, hvis testlaboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og har fastlagt et historisk positivt kontrolområde. Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede prøver på objektglas eller cellesuspensionsprøver, alt efter den anvendte scoringsmetode). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrolforsøg (f.eks. hver 6.-18. måned), f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

Positive kontrolkemikalier bør frembringe en påviselig forøgelse af frekvensen for mikrokerner over det spontane niveau. Ved anvendelse af manuel scoring ved mikroskopi bør der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol administreres på anden vis end testkemikaliet ved hjælp af et andet behandlingsprogram, eller at prøveudtagningen kun forekommer på et bestemt tidspunkt. Hvis det er hensigtsmæssigt, bør der anvendes kemisk beslægtede positive kontrolkemikalier. Eksempler på positive kontrolkemikalier findes i tabel 1.

Tabel 1

Nedenfor er opstillet eksempler på positive kontrolkemikalier:

Kemikalier og CAS-registreringsnummer
Ethylmethansulfonat [CASRN 62-50-0]
Methylmethansulfonat [CASRN 66-27-3]
Ethylnitrosourinstof [CASRN 759-73-9]
Mitomycin C [CASRN 50-07-7]
Cyclophosphamidmonohydrat [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Triethylenmelamin [CASRN 51-18-3]
Colchicin [CASRN 64-86-8] eller vinblastin [CASRN 865-21-4] — som aneugener

Negative kontroller

Dyr i den negative kontrolgruppe bør inkluderes på alle prøveudtagningstidspunkter og ellers håndteres på samme måde som behandlingsgrupperne, bortset fra at de ikke behandles med testkemikaliet. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel/bærestof til administrering af testkemikaliet, bør kontrolgruppen modtage dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis der imidlertid konstant påvises forskelle mellem dyrene og hyppige forekomster af celler med mikrokerner i de historiske negative kontroldata på alle prøveudtagningstidspunkter for testlaboratoriet, er det muligvis kun nødvendigt med en enkelt prøveudtagning til den negative kontrol. Såfremt der bruges en enkelt prøveudtagning til negative kontroller, bør det være det første prøveudtagningstidspunkt, der anvendes i undersøgelsen.

▼M7

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve accepteres i stedet for en sideløbende negativ kontrol for korttidsundersøgelser, når de opnåede resultater er i overensstemmelse med den historiske kontroldatabase for testlaboratoriet. For rotter er det påvist, at forbehandlingsprøver af mindre volumen (f.eks. under 100 µl/dag) har minimal indflydelse på baggrundsforekomsten af mikrokerner (25).

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Generelt er mikrokernerespons ens mellem han- og hundyr, og de fleste undersøgelser kan derfor udføres hos begge køn (26). Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f.eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed, knoglemarvstoksicitet mv., herunder i en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe. Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse af knoglemarv, der udføres i henhold til de i punkt 37 fastlagte parametre med tre dosisgrupper og en sideløbende negativ og positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn) typisk højst kræve 25-35 dyr.

Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (27). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højst tolererede dosis (MTD) defineret som den højeste dosis, som tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet i forhold til varigheden af undersøgelsesperioden (f.eks. ved at fremkalde et fald i kropsvægt eller cytotoksicitet i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (28).

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod på mere end 50 %, men ikke mindre end 20 % af kontrolværdien). Ved analyser af CD71-positive celler i det perifere blodkredsløb (dvs. ved flowcytometri) reagerer denne meget unge fraktion af umodne erythrocytter imidlertid hurtigere på toksiske udfordringer end den større RNA-positive kohorte af umodne erythrocytter. Derfor kan der være tegn på en højere tilsyneladende toksicitet med akut eksponeringsdesign ved undersøgelse af den CD71-positive umodne erythrocytfraktion i forhold til dem, der indikerer umodne erythrocytter baseret på RNA-indhold. Af denne grund kan den højeste dosis for testkemikalier, der forårsager toksicitet, når forsøg skal behandles i fem dage eller mindre, defineres som den dosis, der forårsager en statistisk signifikant reduktion i andelen af CD71-positive umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter, men ikke mindre end 5 % af kontrolværdien (29).

▼M7

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, som kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang indgivelsesperiode, kan være undtagelser fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke højere end 4. Hvis testkemikaliet ikke fremkalder toksicitet i en forundersøgelse eller på grundlag af eksisterende data, bør den højeste dosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover være 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller for indgivelsesperioder på under 14 dage, 2 000 mg/kg kropsvægt/dag. Hvis testkemikaliet imidlertid frembringer toksicitet, bør MTD være den højeste administrerede dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvist dække et interval fra maksimum til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere.

Grænsetest

Hvis dosisforprøver eller eksisterende data fra beslægtede dyrestammer viser, at en behandling med som minimum grænsedosen (beskrevet nedenfor) ikke frembringer observerbare toksiske virkninger (herunder ingen formindskelse af knoglemarvsproliferation eller andre beviser på målvævets cytotoksicitet), og hvis der ikke forventes genotoksicitet baseret på in vitro-genotoksicitetsundersøgelser eller data fra strukturelt beslægtede kemikalier, er det ikke nødvendigt med en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer, forudsat at det er påvist, at testkemikaliet når målvævet (knoglemarven). I så fald kan det være tilstrækkeligt med et enkeltdosisniveau ved grænsedosis. For indgivelsesperioder på 14 dage eller derover er grænsedosis 1000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgivelsesperioder på mindre end 14 dage er grænsedosis 2000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand, topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales generelt ikke, eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering og kun bør anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikaliet iblandes føde eller drikkevand, navnlig med hensyn til enkeltdosering, bør det tilsikres, at tidsforskellen mellem indtagelse af føde og drikkevand og prøveudtagning er tilstrækkelig stor til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 37). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder bør begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende testkemikalier, som normalt vil frembringe kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testmængden variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

▼M7

Behandlingsplan

Der udføres fortrinsvist to eller flere behandlinger indgivet med 24 timers mellemrum, navnlig ved at integrere denne test i andre toksicitetsundersøgelser. Alternativt kan der indgives enkeltbehandlinger, hvis det er videnskabeligt begrundet (f.eks. kemikalier, der er kendt for at blokere cellecyklus). Testkemikalier kan også indgives som to deldoser, dvs. to eller flere behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større volumen. Under disse omstændigheder, eller når kemikaliet indgives ved inhalation, bør prøveudtagningstidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den seneste indgivelse eller ved slutningen af eksponeringen.

Testen kan udføres på mus eller rotter på en af tre måder:

a. Dyrene behandles med testkemikaliet en gang. Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange (fra uafhængige grupper af dyr), første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen, medmindre et testkemikalie er kendt for at have en usædvanlig lang halveringstid. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen bør begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange (fra samme gruppe af dyr), tidligst 36 timer efter behandlingen og med et eller flere passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Ved første prøveudtagning bør alle dosisgrupper behandles, og der bør udtages prøver med henblik på analyse. Ved de(n) senere prøveudtagning(er) er det imidlertid kun den højeste dosis, som skal indgives. Når der påvises et positivt svar ved et prøveudtagningstidspunkt, er der ikke behov for yderligere prøver, medmindre der er brug for kvantitative dosis/respons-oplysninger. De beskrevne høsttidspunkter er en følge af mikrokernernes kinetik for tilstedeværelse og fravær i disse to vævsområder.

b. Benyttes der to daglige behandlinger (f.eks. to behandlinger med to timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver en gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, eller for perifert blods vedkommende en gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (30). De beskrevne høsttidspunkter er en følge af mikrokernernes kinetik for tilstedeværelse og fravær i disse to vævsområder.

c. Benyttes der tre eller flere daglige behandlinger (f.eks. tre eller flere behandlinger med ca. 24 timers mellemrum), bør knoglemarvsprøver indsamles senest 24 timer efter den sidste behandling, og perifert blod bør indsamles senest 40 timer efter den sidste behandling (31). Denne behandlingsmulighed gør det muligt at kombinere kometassays (f.eks. prøveudtagning 2-6 timer efter den sidste behandling) med mikrokernetesten og integrere mikrokernetesten med undersøgelserne af toksicitet ved gentagen indgivelse. Akkumulerede data tydede på, at der kan observeres mikrokerneinduktion i disse bredere tidsrammer ved tre eller flere indgivelser (15).

Andre doserings- eller prøveudtagningsregimer kan anvendes, hvor det er relevant og videnskabeligt begrundet og for at fremme integrationen med andre toksicitetstest.

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start, mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagne doser og

▼M7

ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives humant før testperiodens udløb (28). Under visse omstændigheder kan dyrs kropstemperatur overvåges, da behandlingsinduceret hyper- og hypotermi har været medvirkende til at frembringe falske resultater (32) (33) (34).

Eksponering af målvæv

Der bør på passende tidspunkt(er) tages en blodprøve for at gøre det muligt at undersøge plasmaniveauet i testkemikaliet med henblik på at påvise, at der er sket eksponering af knoglemarven, hvor der er grundlag for dette, og hvor der ikke findes andre eksponeringsdata (jf. punkt 48).

Præparering af knoglemarv/blod

Knoglemarvceller udtages normalt fra dyrenes lårben eller skinneben umiddelbart efter human aflivning. Sædvanligvis udtages cellerne, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Der kan udtages små mængder perifert blod i henhold til passende standarder for dyrevelfærd, enten ved hjælp af en metode, der lader forsøgsdyret overleve, som f.eks. ved blødning fra halevenen eller et andet egnet blodkar, eller ved hjertepunktur eller prøveudtagning fra et stort blodkar ved aflivning. For både knoglemarv eller erythrocytter fra perifert blod kan cellerne, afhængigt af analysemetoden, straks farves supravitalt (16) (17) (18), idet udstrygningspræparater fremstilles og derefter farves til mikroskopi eller fikseres og farves behørigt med henblik på flowcytometrianalyse. Ved at bruge en DNA-specifik farvning [f.eks. acridinorange (35) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] kan man undgå nogle af de artefakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa ved mikroskopianalyse). Supplerende systemer [f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (37) (38)] kan også benyttes, forudsat at disse systemer påviseligt er kompatible med præpareringen af prøven i laboratoriet.

Hvis disse metoder kan anvendes, kan der anvendes anti-kinetokor-antistoffer (39), FISH med pancentromeriske DNA-prober (40) eller primet in situ-mærkning med pancentromerspecifikke primere og egnet DNA-kontrastfarvning (41) til at identificere arten af mikrokerner (kromosom/kromosomfragment) med henblik på at fastslå, om induktionen af mikrokerner skyldes klastogen og/eller aneugen aktivitet. Andre metoder til differentiering mellem klastogener og aneugener kan anvendes, hvis de har vist sig at være effektive.

Analyse (manuel og automatisk)

Alle objektglas eller prøver til analyse, herunder til positive og negative kontroller, bør kodes uafhængigt inden nogen form for analyse og bør randomiseres, så den manuelle bedømmer ikke har kendskab til behandlingsbetingelsen; denne bedømmelse er ikke nødvendig, når der anvendes automatiske scoringssystemer, som ikke bygger på visuel inspektion og ikke kan påvirkes af operatørbias. For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 500 erythrocytter i alt for knoglemarv og 2 000 erythrocytter for perifert blod (42). For hvert dyr scores mindst 4 000 umodne erythrocytter for forekomsten af umodne etythrocytter med mikrokerner (43). Hvis den historiske negative kontroldatabase viser, at den gennemsnitlige baggrundsfrekvens for umodne erythrocytter med mikrokerner er < 0,1 % i testlaboratoriet, bør det overvejes at score flere celler. Når prøverne analyseres, bør andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter hos behandlede dyr ikke være mindre end 20 % af forholdet mellem bærestof-/opløsningsmiddelkontrol ved

▼M7

scoring ved mikroskopi og ikke mindre end ca. 5 % af forholdet mellem bærestof-/opløsningsmiddelkontrol ved scoring af CD71+ umodne erythrocytter CD71+ ved cytometrimetoder (jf. punkt 31) (29). For et knoglemarvsassay scoret ved mikroskopi gælder det f.eks., at hvis kontrolandelen af umodne erythrocytter i knoglemarven er 50 %, vil den øvre grænse for toksicitet være 10 % umodne erythrocytter.

Da rottemilten udskiller og destruerer erythrocytter med mikrokerner, foretrækkes det for at fastholde en høj følsomhed i assayet ved analyse af perifert blod at begrænse analysen af umodne erythrocytter med mikrokerner til den yngste fraktion. Ved hjælp af automatiserede analysemetoder kan disse mest umodne erythrocytter identificeres på basis af deres høje indhold af RNA eller det høje niveau af transferrinreceptorer (CD71+) udtrykt på deres overflade (31). En direkte sammenligning af forskellige farvningsmetoder har imidlertid vist, at der kan opnås et tilfredsstillende resultat med forskellige metoder, herunder traditionel acridinorangefarvning (3) (4).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. For hvert dyr registreres antallet af scorede umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerne og andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Når mus behandles kontinuerligt i fire uger eller derover, bør der også anføres data om antallet og andelen af modne erythrocytter med mikrokerner, hvis de indsamles. Data om dyretoksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Følgende kriterier bestemmer, om testen kan accepteres:

a. De sideløbende negative kontroldata anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase (jf. punkt 15-18)).

b. Sideløbende positive kontroller eller scoringskontroller bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol (jf. punkt 24-25).

c. Der er analyseret et passende antal doser og celler.

d. Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 30-33.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

a. Mindst en af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerner sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b. Denne stigning er dosisafhængig på mindst et prøveudtagningstidspunkt, når den evalueres med en passende trend test.

c. Et hvilken som helst af disse resultater ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

▼M7

Hvis det kun er den højeste dosis, der undersøges på et bestemt prøveudtagningstidspunkt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis der er en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol, og resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %). Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (44) (45) (46) (47). Ved en dosis/respons-analyse bør mindst tre behandlede dosisgrupper analyseres. I de statistiske test bør dyret anvendes som forsøgsenhed. Positive resultater af mikrokernetesten viser, at testkemikaliet fremkalder mikrokerner, som er en følge af kromosombeskadigelse eller beskadigelse af mitoseapparatet hos erythroblaster i testarten. I det tilfælde, hvor der blev foretaget en test med henblik på at påvise centromerer i mikrokerner, er et testkemikalie, der producerer mikrokerner indeholdende centromer (DNA-centromer eller kinetokor, tegn på hele kromosomtab) tegn på, at testkemikaliet er et aneugen.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

a. Ingen af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerner sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

b. Der er ingen dosisrelateret stigning på noget prøveudtagningstidspunkt, når dette vurderes i en egnet trend test.

c. Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

d. Knoglemarven blev eksponeret for testkemikaliet.

Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (44) (45) (46) (47). Dokumentation for knoglemarvens eksponering for et testkemikalie kan omfatte et fald i forholdet mellem umodne og modne erythrocytter eller måling af plasma eller blodniveauer for testkemikaliet. I tilfælde af intravenøs indgivelse er der ikke behov for dokumentation for eksponering. Alternativt kan der anvendes ADME-data indsamlet i en uafhængig undersøgelse under anvendelse af den samme metode og de samme arter til påvise knoglemarvseksponering. Negative resultater viser, at testkemikaliet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter hos testarterne.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser af de afsluttede forsøg. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at analysere flere celler eller foretage en ny undersøgelse under anvendelse af modificerede forsøgsbetingelser.

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om testkemikaliet fremkalder enten positive eller negative resultater, og konklusionen er derfor, at undersøgelsen er tvetydig.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

▼M7

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

— begrundelse for valg af bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

— fastlæggelse af sammensætning af føde, drikkevand eller inhalationsformulering

— analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominel koncentration), når disse foretages.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— dyrenes antal, alder og køn

— kilde, miljøbetingelser, føde mv.

— metode til entydig identifikation af dyr

— for korttidsundersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning; for undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontroldata

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om præparering af testkemikaliet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— begrundelse for indgivelsesvej og -varighed

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet eller testkemikalierne er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

▼**M7**

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant

— oplysninger om foder og vandkvalitet

— aflivningsmetode

— analgesimetode (hvis anvendt)

— detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg

— metoder til præparering af objektglas

— procedurer for isolering og bevaring af prøver

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for scoring af umodne erythrocytter med mikrokerner

— antal analyserede celler pr. dyr ved fastsættelse af frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerner og ved fastsættelse af forholdet mellem umodne og modne erythrocytter

— kriterier for accept af undersøgelsen

— metoder som f.eks. anvendelse af anti-kinetokor-antistoffer eller centromerspecifikke DNA-prober til bestemmelse af, om mikrokerner indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant.

Resultater:

— dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— andel af umodne erythrocytter i forhold til samlet antal erythrocytter

— antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr

— gennemsnit ± standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe

— dosis/respons-forhold, hvor muligt

— statistiske analyser og anvendte metoder

— sideløbende negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— historisk negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen samt tidsperiode og antal datapunkter

— data for, at eksponering af knoglemarven fandt sted

— karakteriseringsdata, der viser, om mikrokerner indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant

— opfyldte kriterier for en positiv eller negativ respons.

▼M7

Diskussion af resultater.

Konklusion.

Referencer.

LITTERATUR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), »In Vivo Cytogenetics Assays«, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

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

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

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

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Centromer: Region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Erythroblast: Et tidligt stadium af erythrocytudvikling umiddelbart forud for den umodne erythrocyt, hvor cellen stadig indeholder en kerne.

Kinetokor: Proteinstruktur, der dannes på centromeren af eukaryote celler, der forbinder kromosomet til mikrotubule polymerer fra mitotisk spindel under mitose og meiose og funktioner under celledeling til at trække søsterkromatider fra hinanden.

Mikrokerner: Små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Normokromatisk eller moden erythrocyt: En fuldmoden erythrocyt, der har mistet den resterende RNA, der er tilbage efter enukleation, og/eller har mistet andre kortvarige cellemarkører, der typisk forsvinder efter enukleation efter den endelige erythroblastdeling.

Polykromatisk eller umoden erythrocyt: En nydannet erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som farves med både blå og røde elementer af klassiske blodfarver såsom Wrights Giemsa på grund af tilstedeværelsen af resterende RNA i den nydannede celle. Disse nydannede celler er omtrent de samme som retikulocytter, som vises ved hjælp af en vital farvning, der får den resterende RNA til at klumpe sammen i et retikulum. Andre metoder, herunder monokromatisk farvning af RNA med fluorescerende farvestoffer eller mærkning af kortvarige overflademarkører såsom CD71 med fluorescerende antistoffer, anvendes nu ofte til at identificere den nyoprettede røde blodcelle. Polykromatiske erythrocytter, retikulocytter og CD71-positive erythrocytter er alle umodne erythrocytter, men har en noget forskellig aldersfordeling.

Retikulocyt: En nydannet erythrocyt farvet med en vital farvning, der får resterende cellulært RNA til at klumpe sig sammen i et karakteristisk retikulum. Retikulocytter og polykromatiske erythrocytter har nogenlunde samme cellulære aldersfordeling.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

▼M7

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-MIKROKERNEASSAYET

Faktormodellen og dens analyse

I denne model testes mindst fem hanner og fem hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ([1]). Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også inddeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponserne er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved »Design of Experiment«-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

([1]) Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

▼**M7**

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

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

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

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

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

Winer, B.J. (1997). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

▼B

B.13/14. **MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER**

1. **METODE**

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. INDLEDNING

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der aminosyrekrævede stammer af Salmonella typhimurium og Escherichia coli til at påvise punktmutationer med substitution, addition eller deletion af et eller nogle få dna-basepar (1) (2) (3). Princippet i denne tilbagemutationstest med bakterier er, at den påviser mutationer, som tilbagemuterer mutationer i teststammerne og dermed sætter bakterien i stand til at syntetisere en essentiel aminosyre. Revertantbakterierne påvises ved deres evne til at vokse uden den aminosyre, som den oprindelige teststamme kræver.

Punktmutationer er årsagen til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og der er meget, der tyder på, at punktmutationer i onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler spiller en rolle for dannelse af tumorer hos mennesker og i forsøgsdyr. Tilbagemutationstesten med bakterier er hurtig, billig og forholdsvis let at udføre. Mange teststammer har forskellige egenskaber, der gør dem mere følsomme til påvisning af mutationer, bl.a. responsive dna-sekvenser på reversionsstedet, høj cellepermeabilitet for store molekyler og manglende dna-reparationssystemer eller forstærkede fejlbehæftede dna-reparationsprocesser. Teststammernes specificitet kan give nyttige oplysninger om, hvilke typer mutationer et gentoksisk stof inducerer. Der findes en meget stor database med resultater for en lang række strukturer med tilbagemutationstest med bakterier, og der er udviklet veletablerede metodologier for test af kemikalier med forskellige fysiske og kemiske egenskaber, herunder flygtige forbindelser.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

En **tilbagemutationstest** med enten Salmonella typhimurium eller Escherichia coli påviser mutation i en aminosyrekrævende stamme (histidin eller tryptophan) til en stamme, der er uafhængig af tilførsel af aminosyren udefra.

Mutagener for baseparsubstitution er stoffer, der forårsager en baseændring i dna'et. I en tilbagemutationstest kan denne ændring ske samme sted som den oprindelige mutation eller et andet sted i bakteriens genom.

Læserammemutagener er stoffer, der medfører insertion eller deletion af et eller flere basepar i dna'et, således at RNA'ets læseramme ændres.

▼B

1.5. INDLEDENDE OVERVEJELSER

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der prokaroytiske celler, som adskiller sig fra pattedyrceller med hensyn til f.eks. optagelse, metabolisme, kromosomstruktur og dna-reparationsprocesser. In vitro-test kræver normalt en exogen kilde til metabolismeaktivering. In vitro-metabolismeaktiveringssystemer kan ikke fuldstændig efterligne in vivo-forholdene i pattedyr. Testen vil derfor ikke give direkte oplysninger om et stofs mutagene og carcinogene potentiale i pattedyr.

Tilbagemutationstesten med bakterier anvendes generelt til en indledende screening for gentoksiske virkninger og, især, punktmutationsinducerende aktivitet. Det er ved hjælp af en omfattende database påvist, at mange kemiske stoffer, som giver positivt resultat i denne test, også har mutagen virkning i andre test. Der findes mutagene stolfer, der ikke er påvist ved denne test; årsagen hertil kan tilskrives det påviste endpoints specifikke karakter, forskelle i metabolismeaktivering og forskelle i biotilgængelighed. På den anden side kan faktorer, der øger tilbagemutationstestens følsomhed, føre til et for højt skøn over stoffets mutagene aktivitet.

Tilbagemutationstesten med bakterier kan være uegnet til evaluering af bestemte klasser af kemiske stoffer, f.eks. stærkt baktericide forbindelser (f.eks. visse antibiotika) og forbindelser, der antages (eller vides) at gribe specifikt ind i pattedyrcellers replikationssystem (f.eks. visse topoisomeraseinhibitorer og visse nucleosidanaloger). I sådanne tilfælde kan mutationstest i pattedyr være mere velegnede.

Selv om mange af de stoffer, der er positive i denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, er korrelationen ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de virker via andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Opslæmninger af bakterieceller udsættes for teststoffet med og uden et exogent metabolismeaktiveringssystem. Ved pladeinkorporeringsmetoden blandes disse opslæmninger med en topagar og hældes ud på et minimalsubstrat. Ved præinkubationsmetoden inkuberes behandlingsblandingen, hvorefter den blandes med topagar inden udhældning på minimalsubstrat. For begge metoders vedkommende tælles revertantkolonierne efter to-tre dages inkubation, og der sammenlignes med antallet af spontane revertantkolonier på kontrolpladerne med opløsningsmiddel.

Der er beskrevet en række fremgangsmåder for udførelse af tilbagemutationstesten med bakterier, Blandt de mest almindeligt benyttede er pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuationsmetoden (9) (10) og suspensionsmetoden (11). Der er beskrevet modifikationer til test af gasser og dampe (12).

▼B

De i denne metode beskrevne fremgangsmåder vedrører især pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. De er begge acceptable til udførelse af forsøgene både med og uden metabolismeaktivering. Nogle stoffer, bl.a. kortkædede alifatiske nitrosaminer, divalente metaller, aldehyder, azofarvestoffer og diazoforbindelser, pyrollizidinalkaloider, allylforbindelser og nitroforbindelser (3), kan mest effektivt påvises ved præinkubationsmetoden. Det er også kendt, at visse klasser af mutagener ikke altid påvises ved standardmetoder som f.eks. pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. Sådanne tilfælde bør betragtes som »særtilfælde«, og det anbefales kraftigt at anvende alternative metoder til påvisning i disse tilfælde. Følgende »særtilfælde« er konstateret (samt eksempler på fremgangsmåder, der kan benyttes til påvisning): azofarvestoffer og diazoforbindelser (3) (5) (6) (13), gasser og flygtige stoffer (12) (14) (15) (16) og glycosider (17) (18), Afvigelser fra standardmetoden skal begrundes sagligt.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Præparater**

1.5.1.1. *Bakterier*

Friske bakteriekulturer fremdyrkes til den sidste del af den eksponentielle fase eller til begyndelsen af den stationære fase (ca. 10^9 celler pr. ml). Kulturer sidst i den stationære fase bør ikke benyttes. Det er vigtigt, at de kulturer, der benyttes i forsøgene, har et højt indhold af levedygtige bakterier. Titeren kan godtgøres enten ved hjælp af tidligere kontroldata for vækstkurver eller ved bestemmelse af antallet af levedygtige celler i det enkelte forsøg ved udpladning.

Som inkubationstemperatur anbefales 37 °C.

Der skal benyttes mindst fem bakteriestammer, deriblandt fire stammer af S. typhimurium (TA1535; TA1537 eller TA97a eller TA97; TA98; og TA100), som er påvist at være pålidelige, og hvis respons er reproducerbar mellem laboratorier. Disse fire S. typhimurium-stammer har GC-basepar på de primære reversionssted, og det vides, at de ikke altid påviser visse oxiderende mutagener, tværbindende stoffer og hydraziner. Sådanne stoffer kan påvises med E. coli WP2-stammer eller S. typhimurium TA102 (19), som har AT-basepar på det primære reversionssted. Derfor kan følgende kombination af stammer anbefales:

— S. typhimurium TA 1535, og

— S. typhimurium TA 1537, TA97 eller TA97a, og

— S. typhimurium TA98, og

— S. typhimurium TA100, og

— E. coli WP2 uvrA, eller E. coli WP2 uvrA (pKM101) eller S. typhimurium TA102.

For at kunne påvise tværbindende mutagener kan det foretrækkes at vælge TA102 eller at tilføje en DNA-reparationsdygtig stamme af E. coli (f.eks. E. coli WP2 eller E. coli WP2 (pKM101)).

▼B

Der benyttes anerkendte metoder til stamkulturfremstilling, markørverifikation og opbevaring. For hver enkelt frosset kulturpræparat påvises den aminosyrebetingede vækst (histidin for S. typhimurium-stammer og tryptophan for E. coli-stammer). Andre fænotypiske egenskaber skal kontrolleres på lignende måde, således tilstedeværende eller manglende R-faktorplasmider, når det er relevant (dvs. ampicillinresistens hos TA98-stammen, TA-100- og TA97a- eller TA97-stammcn, WP2 uvrA-stammen og WP2 uvrA (pKM101)-stammen, samt ampicillin- og tetracyclinresistens hos TA102-stammen), tilstedeværelse af karakteristiske mutationer (dvs. rfa-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for krystalviolet og uvrA-mutation hos E. coli eller uvrB-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for ultraviolet lys) (2) (3). Stammerne skal ligeledes give kimtal for spontane revertanter inden for den hyppighed, der må forventes ud fra laboratoriets hidtidige kontroldata, og helst inden for den hyppighed, der er angivet i litteraturen.

1.5.1.2. *Substrat*

Der benyttes en egnet minimalagar (f.eks. med Vogel-Bonner minimalsubstrat E og glucose) og en topagar med histidin og biotin eller tryptophan, så der tillades nogle få celledelinger (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolismeaktivering*

Bakterierne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerede stoffer såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (18) (20) (21). Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 5-30 % (v/v) i S9-blandingen. Valg af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration. For azofarvestoffer og diazoforbindelser kan et reduktivt metabolismeaktiveringssystem være mere velegnet (6) (13).

1.5.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af bakterierne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof skal være kompatibel med bakteriernes overlevelse og S9-aktiviteten (22). Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie.

▼B

1.5.2. **Testbetingelser**

1.5.2.1. *Teststammer (se punkt 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Eksponeringskoncentration*

Stoffets cytotoksicitet og dets opløselighed i den endelige testblanding er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme toksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg. Cytotoksicitet kan påvises ved et fald i antallet af revertantkolonier, ved en opklaring eller hæmning af baggrundsvæksten eller ved graden af overlevelse i de behandlede kulturer. Et stofs cytotoksicitet kan ændres ved, at der er metabolismeaktiveringssystemer til stede. Uopløselighed bedømmes ved, at der med det blotte øje kan iagttages udfældning i slutblandingen under de faktiske forsøgsbetingelser.

Der anbefales en maksimal testkoncentration af opløselige ikke-cytotoksiske stoffer på 5 mg/plade eller 5 µl/plade. For ikke-cytotoksiske stoffer, der ikke er opløselige med 5 mg/plade eller 5 µl/plade, skal en eller flere af de undersøgte koncentrationer være uopløselig i slutblandingen. Teststoffer, der er cytotoksiske allerede under 5 mg/plade eller 5 µl/plade. testes op til den cytotoksiske koncentration. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

Der benyttes mindst fem forskellige analyserbare koncentrationer af teststoffer med en afstand på ca. en halv logaritme (√10) mellem koncentrationerne i det indledende forsøg. Ved undersøgelse af en koncentration/respons-sammenhæng kan mindre intervaller være hensigtsmæssigt. Test ved koncentrationer over 5 mg/plade eller 5 µl/plade kan tages under overvejelse, når bedømmelsen vedrører stoffer med et betydeligt indhold af potentielt mutagene urenheder.

1.5.2.3. *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) stammespecifikke kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Der vælges en sådan koncentration i den positive kontrol, at det enkelte forsøg effektivitet godtgøres.

Ved forsøg med metabolismeaktivering udvælges positive kontrol-referencestoffer ud fra den valgte type bakteriestamme.

Nedenfor er der eksempler på stoffer, som er egnede som positive kontrolstoffer i forsøg med metabolismeaktivering:

CAS nr.	Einecs nr.	Stof
781-43-1	212-308-4	9,10-dimethylanthracen
57-97-6	200-359-5	7,1 2-dimethylbenz[*a*]anthracen
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pyren
613-13-8	210-330-9	2-aminoanthracen

▼B

CAS nr.	Einecs nr.	Stof
50-18-0		cyclophosphamid
6055-19-2	200-015-4	cyclophosphamidmonohydrat

Følgende stof er egnet som positivt kontrolstof ved reduktiv metabolismeaktivering:

CAS nr.	Einecs nr.	Stof
573-58-0	209-358-4	Congo-rødt

2-aminoanthracen bør ikke anvendes som eneste indikator for, om .S9-blandingen er effektiv. Hvis der benyttes 2-aminoanthracen, skal hver batch af S9 tillige karakteriseres med et mutagen, der kræver metabolismeaktivering med mikrosomenzymer, f.eks, benzo[a]pyren eller dimethylbenzanthracen.

Nedenfor er der eksempler på stoffer til brug som stammespecifikke positive kontrolstoffer i forsøg uden exogen metabolismeaktivering:

CAS nr.	Einecs nr.	Stof	Stamme
26628-22-8	247-852-1	natriumazid	TA 1535 og TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoacridin	TA 1537, TA 97 og TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 og TA 97a
80-15-9	201-254-7	cumenbydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycin C	WP2 uvrA og TA 102
70-25-7	200-730-1	N-ethyl-N-nitro-N-nitro-soguanidin	WP2, WP2 uvrA og WP2 uvrA (pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinolin-l-oxid	WP2, WP2 uvrA og WP2 uvrA (pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	plasmidholdige stammer

Der kan benyttes andre egnede referencestoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, der kun består af opløsningsmiddel eller bærestof uden teststof, og som behandles på samme måde som de øvrige testgrupper. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

▼B

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Ved pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4) uden metabolismeaktivering blandes normalt 0,05 ml eller 0,1 ml testopløsning, 0,1 ml frisk bakteriekultur (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og 0,5 ml steril buffer med 2,0 ml topagar. Ved forsøg med metabolismeaktivering blandes normalt ca. 0,5 ml metabolismeaktiveringsblanding, indeholdende en passende mængde postmitokondriefraktion (5-30 % (v/v) i metabolismeaktiveringsblandingen), med topagaren (2,0 ml), bakterierne og teststoffet/testopløsningen. Indholdet i de enkelte glas blandes og hældes ud over overfladen på en minimalagarplade. Topagaren henstilles til størkning inden inkubering.

Ved præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) forinkuberes teststof/testopløsning sammen med teststammen (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og steril buffer eller metabolismeaktiveringssystemet (0,5 ml) normalt i 20 minutter ved 30-37 °C, inden der blandes med topagaren, og blandingen hældes ud på overfladen af en minimalagarplade. Normalt blandes 0,05 ml eller 0,1 ml teststof/testopløsning, 0,1 ml bakteriekultur og 0,5 ml S9-blanding eller steril buffer med 2,0 ml topagar. Glassene bør under forinkuberingen beluftes i rysteapparat.

Til forsvarlig bestemmelse af variationen udføres der tredobbelt udpladning ved hvert dosisniveau. Dobbelt udpladning kan accepteres, hvis den begrundes sagligt. Tab af en plade af og til gør ikke nødvendigvis testen ubrugelig.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubering**

Alle plader i hvert forsøg inkuberes ved 37 °C i 48-72 timer. Efter inkuberingen tælles antallet af revertantkolonier pr. plade.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene forelægges som antallet af revertantkolonier pr. plade. Også antallet af revertantkolonier på både negative (opløsningsmiddelkontrol og en eventuel ubehandlet kontrol) og positive kontrolplader oplyses. Tallene for hver enkelt plade, gennemsnittet af revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen opgives for teststoffet og for positive og negative kontrolplader (ubehandlede og/eller med opløsningsmiddel).

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning, behandlingsmetoden (pladeinkorporering eller væske-præinkubation) og metabolismeaktiveringen.

▼B

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte interval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme med eller uden metabolismeaktivering (23). Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (24). Statistisk signifikans bør dog ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en tilbagemutationstest med bakterier viser, at teststoffet fremkalder punktmutationer ved basesubstitution eller læserammeforskydning i genomet hos Salmonella typhimurium og/eller Escherichia coli. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke er mutagent i den undersøge organisme.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Stammer:

— anvendte stammer

— antal celler pr. kultur

— karakteristika for stammen

Testbetingelser:

— mængde teststof pr. plade (mg/plade eller µl/plade) med begrundelse for valg af dosis og pladeantal pr. koncentration

— anvendte substrater

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— behandlingsmetoder

Resultater:

— tegn på toksicitet

— tegn på udfældning

— kimtal for de enkelte plader

▼B

— gennemsnitligt antal revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Arnes, B.N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res. 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt. S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans. K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto. Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D.G. Rowland. I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (198 7), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. food Safety. 8. pp. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutations Res., 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, \V. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium,* Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M.]., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughan, V.L. (1984), Mutagenicity of Benzidinc and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen. 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R.G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology. D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.,G. and Claxton, L.D, (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis. 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A. Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium*. Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Arnes, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dictary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wcdd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella lyphimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Tatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in viiro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Arnes, B.N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T. Green, M.H.L, Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF HPRT- OG XPRT-GENER

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 476 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Den aktuelle reviderede version af TM B.17 afspejler næsten 30 års erfaring med denne test og er desuden et resultat af udviklingen af en ny separat metode til in vitro-test for genmutation i pattedyrceller ved anvendelse af thymidin-kinase-genet. TM B.17 er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).

2. Formålet med in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller er at påvise genmutationer, som induceres af kemikalier. De cellelinjer, der anvendes i disse test, måler fremadmutation i reportergener, mere specifikt det endogene hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase-gen (Hprt i gnaverceller og HPRT i humane celler, kollektivt benævnt Hprt-gen og HPRT-test i denne forsøgsmetode) og transgenet af xanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase (gpt) (benævnt XPRT-testen). I HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Ud over de mutationshændelser, der påvises ved HPRT-testen (f.eks. baseparsubstitutioner, frameshifts, små deletioner og insertioner), kan den autosomale placering af gpt-transgenet muliggøre påvisning af mutationer som følge af større deletioner og muligvis mitotisk rekombination, som ikke kan påvises ved HPRT-test, da Hprt-genet er placeret på X-kromosomet (2) (3) (4) (5) (6) (7). XPRT anvendes for øjeblikket ikke så meget som HPRT-testen i lovgivningsøjemed.

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen kilde til metabolismeaktivering. Det eksogene metabolismeaktiveringssystem efterligner ikke helt in vivo-betingelserne.

5. Der bør omhyggeligt undgås betingelser, som kunne føre til et artefakt positivt resultat (dvs. eventuel interaktion med testsystemet), der ikke skyldes direkte interaktion mellem testkemikalierne og cellens genetiske materiale. Disse betingelser omfatter ændringer i pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller for høje cytotoksicitetsniveauer (13). En cytotoksisk effekt, der er højere end det højst anbefalede cytotoksicitetsniveau, jf. punkt 19, anses for at være for højt til HPRT-testen.

▼M8

6. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om testning af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Mutantceller, der mangler Hprt-enzymaktivitet i HPRT-testen eller xprt-enzymaktivitet i XPRT-testen, er resistente over for de cytostatiske virkninger af purinanalogen 6-thioguanin (TG). Celler, som har Hprt (i HPRT-testen) eller gpt (i XPRT-testen), er følsomme over for TG, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TG, mens normale celler, der indeholder Hprt- (i HPRT-testen) eller gpt-enzymet (i XPRT-testen), ikke kan.

8. Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur eksponeres for testkemikaliet både med og uden eksogen kilde til metabolisk aktivering (jf. punkt 14) i et passende tidsrum (3-6 timer), hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoksisk effekt og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (14) (15) (16) (17). Den cytotoksiske effekt bestemmes ved den relative overlevelse (RS), dvs. kloningseffektiviteten målt umiddelbart efter behandlingsperioden og justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med den negative kontrol (punkt 18 og tillæg 2). Afhængigt af de enkelte celletyper holdes de behandlede kulturer så lang tid i dyrkningsmediet, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal (typisk mindst 7-9 dage). Efter fænotypeekspressionen bestemmes mutantfrekvensen ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantkolonier, og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af kloningseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korrigeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Celler

9. For de celletyper, der benyttes i HPRT- og XPRT-test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj kloningseffektivitet, stabil karyotype og stabil spontan mutationsfrekvens. De celler, der sædvanligvis anvendes i HPRT-test, er cellelinjerne CHO, CHL og V79 fra kinesisk hamster, L5178Y-muselymfomceller og de humane lymfoblastceller TK6 (18) (19). CHO-afledte AS52-celler, som indeholder gpt-transgenet (og hvor Hprt-genet er deleteret), anvendes til XPRT-testen (20) (21). HPRT-testen kan ikke udføres i AS52-celler, da hprt-genet er deleteret. Anvendelse af andre cellelinjer bør begrundes og valideres.

10. Cellelinjerne bør kontrolleres regelmæssigt for et stabilt normalt kromosomtal og fravær af mykoplasmakontaminering (22) (23), og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det normale kromosomtal har ændret sig, bør cellerne ikke anvendes. Den normale cyklustid for celler, der benyttes i

▼M8

testlaboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber. Den spontane mutantfrekvens i stamcellekulturen bør også kontrolleres, og kulturen bør ikke anvendes, hvis ikke mutantfrekvensen er acceptabel.

11. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede eksisterende mutantceller, inden de benyttes i denne test, f.eks. ved dyrkning i HAT-medium for HPRT-test og MPA-medium for XPRT-test (5) (24) (jf. tillæg 1). De rensede celler kan kryopræserveres og derefter tøs op og benyttes som arbejdsceller. De nyoptøede arbejdsceller kan benyttes til testen, når den normale fordoblingstid er nået. Ved udførelsen af XPRT-testen bør en rutinemæssig dyrkning af AS52-celler ske under betingelser, der sikrer, at gpt-transgenet bevares (20).

Medier og dyrkningsbetingelser

12. Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsskåle, fugtig atmosfære på 5 % CO_2 og inkubationstemperatur på 37 °C). Cellekulturer bør altid vedligeholdes under betingelser, der sikrer, at de vokser i log-fase. Det er især vigtigt at vælge medier og dyrkningsbetingelser, som sikrer, at cellerne vokser optimalt i ekspressionsperioden, og at både mutantcellers og ikke-mutantcellers kloningseffektivitet er optimal.

Fremstilling af kulturer

13. Cellelinjer opformeres fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt under behandlings- og ekspressionsperioden (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

Metabolismeaktivering

14. Der bør anvendes eksogene metaboliserende systemer, når der benyttes celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der som standard anbefales, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitochondriefraktion (S9), som fremstilles af levere fra gnavere (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (29) (30) (31) (32). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (33) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med blandet funktion (29) (31). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Valget af type og koncentration af det eksogene metabolismeaktiveringssystem eller det anvendte metaboliske inducerende stof kan afhænge af, hvilken kemisk klasse de testede stoffer tilhører (34) (35) (36).

Præparering af testkemikaliet

15. Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 16). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes testsystemet direkte og/eller fortyndes inden behandlingen i testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende ændring af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede dyrkningsskåle (37) (38). Testkemikaliet bør præpareres umiddelbart inden behandlingen, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabelt.

▼M8

TESTBETINGELSER

Opløsningsmidler

16. Opløsningsmidlet vælges for at optimere testkemikaliets opløselighed uden at påvirke testforløbet negativt, f.eks. ved ændring af cellevækst, påvirkning af testkemikaliets integritet, reaktion med dyrkningsskåle eller blokering af metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er f.eks. vand og dimethylsulfoxid. Generelt bør organiske opløsningsmidler ikke overstige 1 % (v/v), og vandige opløsningsmidler (fysiologisk saltopløsning eller vand) bør ikke overstige 10 % (v/v) af det færdige behandlingsmedium. Hvis ikke de anvendte opløsningsmidler er veletablerede (f.eks. ethanol eller acetone), bør de underbygges af data, der påviser deres kompatibilitet med testkemikaliet og testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Hvis ikke der foreligger sådanne understøttende data, er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (jf. tillæg 1) for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke forårsager skadevirkninger eller mutagene virkninger.

Måling af cytotoksisk effekt og valg af eksponeringskoncentrationer

17. Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør der undgås koncentrationer, som kan frembringe artefakt positive responser, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksisk effekt (jf. punkt 20), udfældning i dyrkningsmediet (jf. punkt 21) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (jf. punkt 5). Hvis testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-værdien justeres ved bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå artefakt positive resultater og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

18. Valget af koncentration baseres på cytotoksisk effekt og andre betragtninger (jf. punkt 20-22). Evaluering af cytotoksisk effekt i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, men en indledende test er ikke påkrævet. Selv om der foretages en indledende evaluering af den cytotoksiske effekt, skal den cytotoksiske effekt på hver enkelt kultur stadig måles i hovedforsøget. Den cytotoksiske effekt bør evalueres ved anvendelse af RS, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen baseret på celletal sammenlignet med den justerede kloningseffektivitet i negative kontroller (med en overlevelsesprocent på 100 %) (jf. formlerne i tillæg 2).

19. Mindst fire testkoncentrationer (bortset fra opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (egnet cytotoksisk effekt, antal celler mv.), bør vurderes. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, kan der ved hver af de testede koncentrationer også anvendes replikate kulturer eller enkeltkulturer. De resultater, der opnås i uafhængige replikate kulturer ved en given koncentration, bør rapporteres separat, men kan samles med henblik på dataanalyse (17). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoksisk effekt, vil koncentrationsintervaller på ca. to til tre gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoksisk effekt, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra den koncentration, der frembringer cytotoksisk effekt, til de koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoksisk effekt. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at dække hele cytotoksicitetsintervallet eller

▼M8

undersøge koncentration/respons-forholdet nærmere kan det være nødvendigt at bruge koncentrationer, der ligger tættere på hinanden, og mere end fire koncentrationer, navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 43). Det kan være særligt vigtigt at bruge mere end fire koncentrationer, når der anvendes enkeltkulturer.

20. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoksisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå mellem 20 og 10 % RS. Der bør udvises forsigtighed ved fortolkning af positive resultater, der kun findes ved 10 % RS eller derunder (punkt 43).

21. For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoksiske ved lavere koncentrationer end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller i et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliet. Selv om der forekommer cytotoksisk effekt over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun én koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i testens forløb. Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

22. Hvis ikke der observeres bundfald eller begrænsende cytotoksisk effekt, bør den højeste testkoncentration være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 μl/ml (den laveste af de tre) (39) (40). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning (UVCB'er)) (41), miljømæssige udtræk osv., kan det være nødvendigt at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoksisk effekt for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (42).

Kontroller

23. Der bør under alle forsøgsbetingelser indgå sideløbende negative kontroller (jf. punkt 16), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, idet prøverne ellers behandles på samme måde som behandlingskulturerne.

24. Der skal gennemføres sideløbende positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere mutagener i henhold til den anvendte testprotokol og effektiviteten af det eksogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolstoffer kan anvendes, hvis der er belæg for det. Fordi in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede, kan der udføres test med behandlinger med eller uden eksogen metabolismeaktivering ved brug af kun én positiv kontrol, som kræver metabolismeaktivering. I dette tilfælde vil denne ene positive kontrolrespons påvise såvel aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet som testsystemets reaktionsevne. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed, og responsen bør ikke bringes i fare på grund af cytotoksisk effekt, der overskrider de grænser, som er fastsat i forsøgsmetoden (jf. punkt 20).

▼M8

Tabel 1

Anbefalede referencestoffer til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller

Metabolismeaktivering	Locus	Stof og CAS-nr.
Ingen eksogen metabolismeaktivering	*Hprt*	Ethylmethansulfonat [CAS-nr. 62-50-0] Ethylnitrosourea [CAS-nr. 759-73-9] 4-nitroquinolin-1-oxid [CAS-nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrin [CAS-nr. 3930-19-6] Mitomycin C [CAS-nr. 50-07-7]
Eksogen metabolismeaktivering	*Hprt*	3-methylcholanthren [CAS-nr. 56-49-5] 7,12-dimethylbenzanthracen [CAS-nr. 57-97-6] Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]

FREMGANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

25. Celler under formering behandles med testkemikaliet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Eksponeringen skal vare et passende stykke tid (normalt er 3-6 timer passende).

26. Det antal celler, der mindst skal anvendes til hver testkultur (kontrol og behandling) i hver enkelt testfase, bør baseres på den spontane mutantfrekvens. En generel retningslinje er at behandle og passere et tilstrækkeligt antal celler til at bevare 10 spontane mutanter i hver kultur i alle testfaser (17). Den spontane mutantfrekvens ligger generelt mellem 5 og 20 × 10-6. For en spontan mutantfrekvens på 5 × 10-6 og for også at opretholde et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller flere) i de kulturer, der behandles ved koncentrationer, som forårsager 90 % cytotoksisk effekt under behandling (10 % RS), skal der behandles mindst 20 × 106 celler. Derudover skal der dyrkes et tilstrækkeligt antal celler (men aldrig under 2 mio.) i ekspressionsperioden, som udplades til mutantudvælgelse (17).

Fænotypeekspressionsperiode og måling af mutantfrekvens

27. Efter endt behandling dyrkes cellerne med henblik på ekspression af den mutante fænotype. Generelt er et minimum på 7-9 dage tilstrækkeligt til at sikre nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede Hprt- og xprt-mutanter (43) (44). I denne periode dyrkes cellerne regelmæssigt i subkultur for at opretholde deres eksponentielle vækst. Efter fænotypeekspression udplades cellerne igen i mediet med og uden selektivt stof (6-thioguanin) til bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og kloningseffektiviteten på udvælgelsestidspunktet. Denne udpladning kan foretages ved anvendelse af skåle til celler i enkeltlagskultur eller mikrotiterplader til celler i suspension. Med henblik på udvælgelse af mutanter bør cellerne udplades med en sådan tæthed, at der sikres optimal mutantrestitution (dvs. at der undgås metabolisk samarbejde) (17). Pladerne inkuberes i et passende tidsrum med henblik på optimal kolonivækst (f.eks. 7-12 dage), og kolonierne tælles. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korrigeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen (jf. formlerne i tillæg 2).

▼M8

Laboratoriets kompetence

28. For at påvise tilstrækkelig erfaring med testen, før den bruges rutinemæssigt, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer (mindst et aktivt med og et aktivt uden metabolismeaktivering udvalgt blandt stofferne i tabel 1), og forskellige negative kontroller (ved anvendelse af forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 30-33.

29. Et udvalg af positive kontrolstoffer (jf. tabel 1 i punkt 25) bør undersøges med og uden metabolismeaktivering med henblik på at påvise evnen til at påvise mutagene kemikalier, vurdere effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet og påvise egnetheden af cellevækstbetingelserne under behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse samt af score-proceduren. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte stoffer, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning i forhold til baggrundsværdierne for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

30. Laboratoriet bør fastlægge:

— et historisk positivt kontrolinterval og en historisk positiv kontrolfordeling

— et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolinterval og en historisk negativ kontrolfordeling.

31. Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de sideløbende negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata (22). Efterhånden som der føjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de sideløbende negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (17) (45) (46).

32. Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men skal helst bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontroldiagrammer (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (47)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (46). Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (45).

33. Negative kontroldata bør bestå af mutantfrekvenser fra enkeltkulturer, dog fortrinsvis fra replikate kulturer som beskrevet i punkt 23. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen i laboratoriets historiske negative kontroldatabase (17) (45) (46). Såfremt dataene for sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. ovenfor) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

▼M8

34. Der bør i forbindelse med eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen tages hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

35. Præsentationen af resultaterne bør omfatte alle de data, der er nødvendige for at beregne den cytotoksiske effekt (udtrykt som RS). Dataene for såvel behandlede kulturer som kontrolkulturer bør omfatte antallet af celler efter endt behandling, antallet af celler, der blev udpladet umiddelbart efter behandlingen, og antallet af kolonier (eller antallet af brønde uden kolonier ved mikrobrøndmetoden). RS for hver kultur bør udtrykkes som en procentdel i forhold til den sideløbende kontrol med opløsningsmiddel (jf. definitioner i tillæg 1).

36. Præsentationen af resultaterne bør endvidere omfatte alle de data, der er nødvendige for at beregne mutantfrekvensen. Dataene for såvel behandlede kulturer som kontrolkulturer bør omfatte: 1) antallet af celler ved udpladning med og uden selektivt stof (på det tidspunkt, hvor cellerne udplades til mutantudvælgelse) og 2) antallet af optalte kolonier (eller antallet af brønde uden kolonier ved mikrobrøndmetoden) på pladerne med og uden selektivt stof. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier (på pladerne med selektivt stof) korrigeret for kloningseffektiviteten (på pladerne uden selektivt stof). Mutantfrekvensen bør udtrykkes som antal mutantceller pr. million levedygtige celler (jf. definitioner i tillæg 1).

37. Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

38. Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

— Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase som beskrevet i punkt 33.

— Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 24) bør fremkalde responser, der er kompatible med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Der blev testet under to forsøgsbetingelser (dvs. med og uden metabolismeaktivering), medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 25).

— Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (punkt 25, 26 og 19).

— Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 20, 21 og 22.

Vurdering og fortolkning af resultater

39. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser:

▼M8

— Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Stigningen er koncentrationsafhængig, når den evalueres med en passende trend-test.

— Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 33).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliet for at kunne fremkalde genmutationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (46) (48).

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

— Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend-test.

— Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 33).

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde genmutationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem.

41. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

42. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv som beskrevet ovenfor, eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Det kan være nyttigt at gennemføre et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse).

43. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker (fortolkes på den måde, at der er lige stor sandsynlighed for, at det er positivt og negativt).

Testrapport

44. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

▼**M8**

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

For laboratoriets stamkulturer:

— celletype, cellelinjernes oprindelse

— eventuelt antal generationer og historien i laboratoriet

— karyotypiske karakteristika og/eller normalt kromosomtal

— metoder til vedligeholdelse af cellekulturer

— fravær af mykoplasma

— cellernes fordoblingstid.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— mediesammensætning, CO_2-koncentration, fugtighedsniveau

— testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)

— koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet

— inkubationstemperatur

— inkubationstid

— behandlingens varighed

— celletæthed under behandlingen

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (oprindelse for S9, metode til fremstilling af S9-blanding, koncentration eller mængde af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)

— positive og negative kontrolstoffer, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse

▼**M8**

— ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)

— det selektive stofs identitet og koncentration

— kriterier for accept af test

— metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller

— metoder anvendt til måling af cytotoksisk effekt

— eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoksisk effekt og anvendt metode

— inkubationstidens varighed efter udpladning

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker

— metoder anvendt til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

— antal behandlede celler og antal celler dyrket i subkultur for hver kultur

— cytotoksicitetsmålinger og eventuelt andre observationer

— tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse

— antal celler udpladet i selektivt og ikke-selektivt medium

— antal kolonier i det ikke-selektive medium og antal resistente kolonier i det selektive medium samt den tilhørende mutantfrekvens

— koncentration/respons-forhold, når det er muligt

— data fra sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive (koncentrationer og opløsningsmidler) kontroller

— historiske negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og konfidensinterval (f.eks. 95 %) samt mængden af data

— statistiske analyser (for de enkelte kulturer og eventuelt for samlede replikater) og eventuelle P-værdier.

Diskussion af resultater

Konklusion

LITTERATUR

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

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. og Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. og Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. og Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. og Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/ XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. og Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. og Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. og Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. og Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. og Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. og Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., og Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. og Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. og Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. og Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. og Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, s. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., og Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., og Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., og Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24):9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing (manuskript under udarbejdelse).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. og Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. og Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. og de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. og Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. og Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. og Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. og Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. og Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. og Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, s. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. og Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. og Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgængelig på: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. og Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

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

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. og Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(40) Brookmire L., Chen J.J. og Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Tilgængelig på: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. og Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., og Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., og Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation, Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., og Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., og Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Baseparsubstitutionsmutagener: kemikalier, der forårsager substitution af basepar i DNA.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kloningseffektivitet: procentdel af celler udpladet ved lav tæthed, som er i stand til at vokse til en koloni, der kan tælles.

Koncentrationer: henviser til endelige koncentrationer af testkemikaliet i dyrkningsmediet.

Cytotoksisk effekt: for de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, identificeres cytotoksisk effekt som en reduktion i de behandlede cellers relative overlevelse sammenlignet med den negative kontrol (jf. det specifikke punkt).

Fremadmutation: en genmutation fra forældretypen til mutantformen, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet eller funktion.

Frameshift-mutagener: kemikalier, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder DNA-brud, addukter, omlejringer, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

HAT-medium: medium indeholdende hypoxanthin, aminopterin og thymidin, der anvendes til rensning af Hprt-mutanter.

Mitotisk rekombination: under mitosen, rekombination mellem homologe kromatider, der muligvis medfører brud på DNA-dobbeltstrenge eller tab af heterozygoti.

MPA-medium: medium indeholdende xanthin, adenin, thymidin, aminopterin og mycophenolinsyre, der anvendes til rensning af Xprt-mutanter.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Mutantfrekvens (MF): antal observerede mutantkolonier divideret med antal celler, som er udpladet i selektivt medium, korrigeret for kloningseffektiviteten (eller levedygtigheden) på udvælgelsestidspunktet.

Fænotypeekspressionsperiode: det tidsrum efter behandling, hvor den genetiske ændring fikseres i genomet, og alle eksisterende genprodukter forsvinder, således at det fænotypiske karakteristikum ændres.

Relativ overlevelse (RS): RS bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoksisk effekt. RS er cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med kloningseffektiviteten i negative kontroller (med en overlevelsesprocent på 100 %).

S9-leverfraktioner: supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

▼**M8**

S9-blanding: blanding af S9-leverfraktionen og andre cofaktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel: generelt udtryk, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Ubehandlet kontrol: kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende og på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer.

▼M8

Tillæg 2

FORMLER FOR VURDERING AF CYTOTOKSISK EFFEKT OG MUTANTFREKVENS

Cytotoksisk effekt evalueres ved den relative overlevelse, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenlignet med den justerede kloningseffektivitet i de negative kontroller (med en overlevelsesprocent på 100 %) (jf. RS-formlen nedenfor).

Den justerede CE for en kultur, som er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$\text{Justeret CE} = \frac{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets afslutning}}{\text{Antal celler ved behandlingsforløbets begyndelse}}$$

RS for en kultur, som er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$\text{RS} = \frac{\text{Justeret CE i den behandlede kultur}}{\text{Justeret CE i kontrolkulturen med opløsningsmiddel}} \times 100$$

Mutantfrekvensen er mutantkoloniers kloningseffektivitet i selektivt medium divideret med kloningseffektiviteten i ikke-selektivt medium målt for den samme kultur på udvælgelsestidspunktet.

$$\text{Mutantfrekvens} = \frac{\text{mutantkoloniers kloningseffektivitet i selektivt medium}}{\text{kloningseffektivitet i ikke — selektivt medium}}$$

Når der anvendes plader til kloningseffektivitet:

CE = antal kolonier / antal celler ved udpladning.

Når der anvendes mikrotiterplader til kloningseffektivitet:

Antallet af kolonier pr. brønd på mikrotiterplader følger en Poisson-fordeling.

Kloningseffektivitet = -LnP(0) / antal celler pr. brønd ved udpladning

Hvor -LnP(0) er det sandsynlige antal tomme brønde ud af de udsåede brønde og beskrives ved følgende formel:

LnP(0) = -Ln (antal tomme brønde / antal celler ved udpladning).

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIPPER FOR TESTMETODEN

Kulturer af pattedyrceller kan anvendes til påvisning in vitro af fænotypiske forandringer, som induceres af kemiske forbindelser, der forbindes med maligne transformationer in vivo. Hyppigt anvendte celletyper er C3H10T$^{1/2}$, 3T3, SHE, Fischer-rotte, og testene bygger på forandringer i cellemorfologien, vækstevnen eller forankringsevnen i blød agar. Der findes også mindre hyppigt anvendte systemer, som bruges til undersøgelse af andre fysiologiske eller morfologiske forandringer i celler som følge af eksponering for karcinogene kemiske forbindelser. Der er ikke beskrevet nogen direkte virkningsmekanistisk forbindelse mellem cancer og de genetiske endpoints, der anvendes i disse in vitro test. Nogle af testsystemerne kan anvendes til påvisning af tumorpromotorer. Den cytotoksiske effekt kan bestemmes ved måling af teststoffets påvirkning af evnen til at danne kolonier (kloningsstyrken) eller af kulturernes vækstrater. Formålet med at måle den cytotoksiske effekt er at konstatere, om eksponeringen for teststoffet er toksikologisk relevant, men kan ikke benyttes til beregning af transformationsfrekvensen i alle test, eftersom nogle kræver lang inkubationstid og/eller overførsel til nye plader.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Forberedelser

Celler

Der kan anvendes en række forskellige cellelinjer eller primærceller, afhængigt af hvilken transformationstest der foretages. Forsøgslederen må sikre, at de anvendte celler undergår relevante fænotypiske forandringer efter eksponering for kendte karcinogener, og forsøgslederens eget laboratorium må have påvist og dokumenteret den anvendte tests validitet og pålidelighed.

Medium

Der anvendes medier og forsøgsbetingelser i overensstemmelse med den anvendte transformationstest.

▼B

Teststof

Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed, vækstrate eller transformationsfrekvens.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celler med endogen metabolisk aktivering, bør det være påvist, at aktiveringsformen egner sig til den form for kemisk forbindelse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Positive og negative kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelser:

  — etylmetansulfonat

  — β-propiolacton

— forbindelser som kræver metabolisk aktivering:

  — 2-acetylaminofluoren

  — 4-dimetylaminoazobenzen

  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringes koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelsesgrad, og overlevelsesgraden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

▼B

Fremgangsmåde

Cellerne eksponeres i en passende periode afhængig af det anvendte testsystem. Dette kan indebære gentagne doseringer med udskiftning af medium (og om nødvendigt ny metabolisk aktivering), hvis der er tale om langvarig eksponering. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på at lade den transformerede fænotype, testen bygger på, komme til udtryk og med henblik på bestemmelse af transformationsfrekvensen. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform og kan foreligge i forskellige former afhængigt af den anvendte test. Der kan f.eks. være tale om optælling på plader, registrering af positive plader eller antal transformerede celler. Når det er relevant, udtrykkes overlevelsesgraden som en procentdel af overlevelsen i kontrolforsøgene, og transformationsfrekvensen udtrykkes som antal transformerede celler pr. overlevende. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte celletype, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, eksponeringens varighed og frekvens, celletæthed under eksponeringen, det anvendte eksogene metaboliske aktiveringssystem, positive og negative kontroller, specifikation af den fænotype testen bygger på, det anvendte selektive system (hvis et sådant er anvendt), begrundelse for valget af doser

— metoder til registrering af levedygtige og transformerede celler

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼M8

B.22. TEST TIL PÅVISNING AF DOMINERENDE DØDELIG MUTATION – GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 478 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Denne ændrede udgave af forsøgsmetoden afspejler mere end 30 års erfaring med denne test og potentialet for testens integration i eller kombination med andre toksicitetstest såsom udviklings-, reproduktionstoksicitets- og genotoksicitetsundersøgelser. Som følge af dets begrænsninger og anvendelsen af et stort antal dyr er assayet dog ikke egnet som primær metode, men snarere som en supplerende forsøgsmetode, der kun anvendes, når der af lovgivningsmæssige hensyn ikke er noget alternativ. Kombinerede toksicitetstest har potentiale til at skåne et stort antal dyr mod at blive anvendt i toksicitetstest. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).

2. Formålet med metoden til påvisning af dominerende dødelig (DL) mutation er at undersøge, hvorvidt kemikalier forårsager mutationer, der skyldes kromosomaberrationer i kønsceller. Derudover er metoden til påvisning af dominerende dødelig mutation relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responsen, selv om de kan være forskellige fra art til art. Induktion af DL-mutation efter eksponering for et testkemikalie viser, at kemikaliet har påvirket forsøgsdyrets kønscellevæv.

3. DL-mutationer forårsager embryon- eller fosterdød. Induktion af DL-mutation efter eksponering for et testkemikalie viser, at kemikaliet har påvirket forsøgsdyrets kønsceller.

4. Et DL-assay er nyttigt til bekræftelse af positive resultater fra test ved anvendelse af somatiske in vivo-endepunkter og er et relevant endepunkt til forudsigelse af farligheden for mennesker og risikoen for genetiske sygdomme, som overføres via kønscellelinjen. Dette assay kræver imidlertid et stort antal dyr og er arbejdskraftintensivt og derfor meget dyrt og tidskrævende at udføre. Da den spontane frekvens af dominerende dødelige mutationer er relativt høj, er assayets følsomhed til påvisning af små stigninger i mutationsfrekvensen generelt begrænset.

5. Definitioner af nøgletermer findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Denne test udføres oftest i mus (2) (3) (4), men andre arter såsom rotter (5) (6) (7) (8) kan i nogle tilfælde anvendes, hvis dette er sagligt begrundet. DL opstår generelt på grund af store kromosomaberrationer (strukturelle anomalier og antalsaberrationer) (9) (10) (11), men genmutationer kan ikke udelukkes. En DL-mutation er en mutation, der opstår i en kønscelle per

▼M8

se eller efter befrugtning fikseres i det tidlige embryon, som ikke forårsager dysfunktion hos gameten, men er dødelig for det befrugtede æg eller embryonet.

7. Hanner parres individuelt med jomfruelige hunner med passende på hinanden følgende intervaller. Antallet af parringer efter behandlingen afhænger af det ultimative formål med DL-undersøgelsen (punkt 23) og bør sikre, at alle faser af hannernes kønscellemodning evalueres for DL (12).

8. Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til testiklerne, er denne test ikke egnet.

PRINCIP FOR TESTEN

9. Normalt eksponeres hanner for et testkemikalie ad en egnet eksponeringsvej, hvorefter de parres med ubehandlede jomfruelige hunner. De forskellige typer kønsceller kan testes ved anvendelse af på hinanden følgende parringsintervaller. Hunnerne aflives et passende stykke tid efter parring, hvorefter deres uterus undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af implantater og levende og døde embryoner. Et testkemikalies dominerende dødelighed bestemmes ved sammenligning af de levende implantater pr. hun i den behandlede gruppe med de levende implantater pr. hun i gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den behandlede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for det tab, som testkemikaliet har forårsaget efter implantation. Tabet efter implantation beregnes ved bestemmelse af forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i den behandlede gruppe sammenlignet med forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i kontrolgruppen. Tabet før implantation kan vurderes ved sammenligning af corpora lutea-antallet minus det samlede antal implantater eller det samlede antal implantater pr. hun i den behandlede gruppe og kontrolgruppen.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

10. Laboratoriets kompetence til udførelse af dette assay bør fastslås ved dets påvisning af, at det kan reproducere frekvensen af dominerende dødelige virkninger fra offentliggjorte data (f.eks. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) med positive kontrolstoffer (herunder svage responser) som dem, der er anført i tabel 1, og kontroller med bærestof, og opnå negative kontrolfrekvenser, der er i overensstemmelse med en acceptabel mængde data (jf. referencer ovenfor) eller eventuelt med laboratoriets historiske kontrolfordeling.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

11. Der bør anvendes sunde kønsmodne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der anvendes sædvanligvis mus, men rotter kan også anvendes. En hvilken som helst anden egnet pattedyrsart kan anvendes, hvis dette begrundes sagligt i rapporten.

▼M8

Miljø og fodringsbetingelser

12. Temperaturen i forsøgslokalet bør for gnavere være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet. Belysningen bør være kunstig og bestå af 12 timers lys efterfulgt af 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Forud for behandling eller parring bør gnavere opbevares i små grupper (højst fem dyr) af samme køn, såfremt der ikke forventes eller observeres aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide bure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

13. Der udvælges tilfældigt sunde kønsmodne voksne hanner og hunner til kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres entydigt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke tå- eller øreklipning) og tilvænnes laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Krydskontaminering mellem den positive kontrol og testkemikaliet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

14. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og definerer hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/bærestof

15. Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltopløsning, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie.

Positive kontroller

16. Der bør altid benyttes dyr til sideløbende positiv kontrol, medmindre laboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og på det seneste har anvendt testen rutinemæssigt (f.eks. inden for de sidste fem år). Det er imidlertid ikke nødvendigt at behandle dyr til positiv kontrol ad samme vej som de dyr, der modtager testkemikaliet, eller udtage prøver i forbindelse

▼M8

med alle parringsintervaller. De positive kontrolstoffer bør være kendt som stoffer, der frembringer DL under de betingelser, der anvendes i testen. Bortset fra behandlingen bør dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

17. Doserne af de positive kontrolstoffer bør vælges, således at de frembringer svage eller moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets ydeevne og følsomhed, men konsekvent frembringer positive dominerende dødelige virkninger. Eksempler på positive kontrolstoffer og hensigtsmæssige doser findes i tabel 1.

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolstoffer

Stof [CAS-nummer] (referencenr.)	Effektivt dosisinterval (mg/kg) (gnaverarter)	Indgivelsestid (dage)
Triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (mus)	1
Cyclophosphamid [50-18-0] (19)	50-150 (mus)	5
Cyclophosphamid [50-18-0] (5)	25-100 (rotter)	1
Ethylmethansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (mus)	5
Monomer acrylamid [79-06-1] (17)	50 (mus)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (mus)	1

Negative kontroller

18. Der bør ved hver prøvetagning indgå negative kontroldyr, som kun behandles med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandles på samme måde som behandlingsgrupperne (20). Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ikke medfører DL eller andre skadelige virkninger, bør der også indgå ubehandlede kontroldyr i hver prøvetagning for at fastslå, at kontrollen med bærestof kan accepteres.

FREMGANGSMÅDE

Antal dyr

19. Hannerne parres individuelt, helst med én jomfruelig hun, med på hinanden følgende og forud fastsatte intervaller af passende længde (f.eks. hver uge, punkt 21 og 23). Antallet af hanner pr. gruppe bør (i kombination med det antal hunner, der parres under hver parringsperiode) være tilstrækkeligt til at sikre den statistiske styrke, der er nødvendig for at påvise mindst en fordobling af DL-frekvensen (punkt 44).

20. Antallet af hunner pr. parringsperiode bør også fastlægges ud fra beregninger af den statistiske styrke, der muliggør påvisning af mindst en fordobling af DL-frekvensen (dvs. tilstrækkeligt mange drægtige hunner til, at der fremkommer mindst 400 implantater i alt) (20) (21) (22) (23), og idet der forventes mindst et dødt implantat pr. analyseenhed (dvs. parringsgruppe pr. dosis) (24).

▼M8

Indgivelsesperiode og parringsintervaller

21. Antallet af parringsintervaller efter behandlingen bestemmes af behandlingsplanen og bør sikre, at alle faser af hannernes kønscellemodning evalueres for DL-induktion (12) (25). Ved indgivelse af en enkelt dosis og op til 5 daglige doser bør der efter den sidste behandling gennemføres 8 parringer (mus) eller 10 parringer (rotter) med ugentlige intervaller. Ved indgivelse af flere doser kan antallet af parringsintervaller reduceres i forhold til den længere indgivelsesperiode, men det skal fortsat være muligt at evaluere alle faser af spermatogenesen (efter 28 dages eksponering er det f.eks. tilstrækkeligt med kun 4 ugentlige parringer for at evaluere alle faser af spermatogenesen i musen). Alle behandlings- og parringsplaner skal begrundes sagligt.

22. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en brunstcyklus (en uge dækker f.eks. en brunstcyklus hos både mus og rotter). De hunner, der ikke har parret sig i løbet af en uge, kan benyttes til en efterfølgende parringsperiode, eller de kan blive hos hannerne, indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

23. Eksponerings- og parringsbetingelserne afhænger af det ultimative formål med DL-undersøgelsen. Hvis formålet er at bestemme, om et givet kemikalie fremkalder DL-mutationer per se, ville den accepterede metode bestå i at eksponere en hel spermatogeneserunde (f.eks. 7 uger i mus, 5-7 behandlinger om ugen) med en efterfølgende parring. Men hvis formålet er at identificere den kønscelletype, der er følsom over for DL-induktion, foretrækkes en enkelt eksponering eller eksponering over 5 dage efterfulgt af ugentlig parring.

Dosisniveauer

24. Hvis der gennemføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (26). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den maksimalt tolererede dosis (MTD) defineret som den maksimale dosis, der tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet, i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. unormal adfærd eller unormale reaktioner, et mindre fald i kropsvægt eller cytotoksisk effekt i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (27).

25. MTD må heller ikke have negativ indvirkning på parringsresultatet (21).

26. Testkemikalier med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra dosisfastsættelseskriterierne og bør evalueres individuelt.

27. For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke over 4. Hvis testkemikaliet ikke frembringer toksicitet i en forundersøgelse eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliet frembringer toksicitet, bør MTD imidlertid være den højeste

▼M8

indgivne dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvis dække et interval fra den højeste dosis til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. For ikke-toksiske kemikalier er grænsedosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, og for indgivelsesperioder på under 14 dage er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

28. Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør tages i betragtning i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom foder, drikkevand, subkutant, intravenøst, topisk, inhalation, oralt (med sonde) eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, som sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke, eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering, og bør kun anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikaliet iblandes foder eller drikkevand, navnlig i forbindelse med enkeltdosering, bør det sikres, at tidsrummet mellem indtagelse af foder og drikkevand og parring er tilstrækkelig stort til, at virkningerne kan påvises (punkt 31). Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen med sonde eller ved injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst må anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Testmængden bør variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Observationer

29. Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start og mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagen dosering samt ved aflivning. Foderindtag bør måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, bør vandindtaget måles ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikke-dødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (27).

Indsamling og behandling af væv

30. Hunnerne aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden på drægtighedsdag (GD) 13 for mus og GD 14-15 for rotter. Uterus undersøges for dominerende dødelige virkninger med henblik på bestemmelse af antallet af implantater, levende og døde embryoner og corpora lutea.

31. Livmoderhorn og ovarier blotlægges til bestemmelse af antallet af corpora lutea, og fostre fjernes, tælles og vejes. Uterus bør undersøges omhyggeligt for resorptioner, der er skjult af levende fostre, og det skal sikres, at alle resorptioner bliver optalt. Fosterdødeligheden registreres. Antallet af befrugtede hunner og det samlede antal implantationer samt antallet af tab før

▼M8

implantation og dødeligheden efter implantation (herunder tidlig og sen resorption) registreres tilsvarende. Desuden kan de synlige fostre præserveres i Bouins væske i mindst to uger, hvorefter de undersøges for væsentlige eksterne misdannelser (28) for at opnå yderligere oplysninger om testkemikaliets reproduktions- og udviklingsvirkninger.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

32. Data bør opstilles i tabelform med angivelse af antal parrede hanner samt antal drægtige og ikke-drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identiteten af hver enkelt han og hun, anføres individuelt. Parringsperioderne og dosisniveauet for de behandlede hanner samt antallet af levende implantater og døde implantater bør anføres for hver enkelt hun.

33. Tabet efter implantation beregnes ved bestemmelse af forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i den behandlede gruppe sammenholdt med forholdet mellem antallet af døde implantater og det samlede antal implantater i gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel.

34. Tabet før implantation beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantater pr. hun i forhold til kontrolparringerne. Hvis der foretages vurdering af tabet før implantation, bør dette anføres.

35. Den dominerende dødelige faktor vurderes som: (antal døde før implantation/samlet antal implantationer pr. hun) × 100.

36. Data om toksicitet og kliniske tegn bør anføres (jf. punkt 29).

Acceptkriterier

37. Følgende kriterier bestemmer, om en test kan accepteres:

— Den sideløbende negative kontrol er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske negative kontroldata og laboratoriets historiske kontroldata, hvis sådanne foreligger (jf. punkt 10 og 18).

— Sideløbende positive kontroller fremkalder responser, der er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske positive kontroldata eller laboratoriets historiske positive kontroldatabase, hvis en sådan foreligger, og medfører en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og 18).

— Et tilstrækkeligt antal implantater og doser er blevet analyseret (punkt 20).

— Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 24 og 27.

Vurdering og fortolkning af resultater

38. Mindst tre behandlede doseringsgrupper bør analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til dosis/respons-analyse.

▼**M8**

39. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

— mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— stigningen er dosisafhængig ved mindst en forsøgsbetingelse (f.eks. ugentlig parring), når den vurderes med en hensigtsmæssig test, og

— et eller flere af resultaterne ligger uden for det acceptable interval for negative kontroldata eller fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for at kunne fremkalde dominerende dødelige mutationer i forsøgsdyrenes kønsceller. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder er beskrevet i punkt 44. Andre anbefalede statistiske metoder findes i litteraturen (20) (21) (22) (24) (29). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

— ingen af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— der ikke indtræder en dosisafhængig stigning ved en af forsøgsbetingelserne, og

— alle resultaterne ligger inden for det acceptable interval for negative kontroldata eller laboratoriets historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde dominerende dødelige mutationer i forsøgsdyrenes kønsceller.

41. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller klart negativ respons.

42. Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv, og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser på baggrund af eksisterende forsøgsdata, herunder undersøgelse af, om det positive resultat ligger uden for det acceptable interval for negative kontroldata eller laboratoriets historiske negative kontroldata (30).

43. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker.

44. I de anvendte statistiske test skal hannen betragtes som forsøgsenheden. Selv om det er muligt at fordele optællingsbaserede data (f.eks. antallet af implantater pr. hun) efter Poisson-metoden, og/eller fordele andelene (f.eks. andelen af døde implantater) efter binomialteorien, bliver sådanne data ofte overdispergeret (31). Tilsvarende bør der ved statistiske analyser først foretages en test for over-/underdispersion ved anvendelse af varianstest såsom Cochrans binomiale varianstest (32) eller Tarones C(α)-test for binomial overdispersion (31) (33). Hvis ikke der påvises nogen afvigelse fra den binomiale dispersion, kan andelsrelaterede tendenser på tværs af dosisniveauer testes ved anvendelse af Cochran-Armitage-trend-testen (34), og parvise sammenligninger med kontrolgruppen kan testes ved anvendelse af Fishers eksakte

▼M8

test (35). Hvis ikke der påvises nogen afvigelse fra Poisson-dispersionen, kan optællingsbaserede tendenser tilsvarende testes ved anvendelse af Poisson-regression (36), og parvise sammenligninger med kontrolgruppen kan testes inden for rammerne af Poisson-modellen ved anvendelse af parvise kontraster (36). Hvis der påvises signifikant overdispersion eller underdispersion, anbefales ikke-parametriske metoder (23) (31). Disse omfatter klassificeringsbaserede test, såsom Jonckheere-Terpstra-testen for tendenser (37) og Mann-Whitney-testene (38) for parvise sammenligninger med gruppen af kontrolkulturer med bærestof/opløsningsmiddel samt permutations-, resamplings- eller bootstrap-testene for tendenser og parvise sammenligninger med kontrolgruppen (31) (39).

45. Et positivt DL-assay dokumenterer testkemikaliets genotoksicitet i kønsceller hos den eksponerede han fra den testede dyreart.

46. Det kan være nyttigt at undersøge, om de observerede værdier ligger inden for eller uden for det historiske kontrolinterval, ved vurderingen af responsens biologiske signifikans (40).

Testrapport

47. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

— begrundelse for valg af bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

▼**M8**

— fastlæggelse af sammensætning af foder, drikkevand eller inhalationsformulering

— analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer), når disse foretages.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.

— metode til entydig identifikation af dyr

— for kortvarige undersøgelser: de enkelte hanners kropsvægt ved testens start og afslutning. For undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

— positive og negative kontroldata (bærestof/opløsningsmiddel)

— data fra forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om præparering af testkemikaliet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— begrundelse for indgivelsesvej

— metoder til måling af dyretoksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt frekvensen for observationer og vejning af dyrene

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet er nået frem til målvævet eller det almindelige kredsløb, hvis der er opnået negative resultater

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og indtagelse, hvis relevant

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— oplysninger om berigelse af miljøet i burene

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøvetagningsplaner samt begrundelser for valg

— analgesimetode

— aflivningsmetode

▼**M8**

— procedurer til isolering og præservering af væv

— oprindelse og batchnummer for alle kits og reagenser (hvis relevant)

— metoder til kvantitativ bestemmelse af DL

— parringsplan

— metoder til konstatering af, om parring har fundet sted

— aflivningstidspunkt

— kriterier for scoring af DL-virkninger, herunder corpora lutea, implantationer, resorptioner og tab før implantation, levende implantater, døde implantater.

Resultater:

— dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— hannernes kropsvægt under behandling og i parringsperioder

— antal parrede hunner

— dosis/respons-forhold, hvor muligt

— data for sideløbende negative kontroller og historiske negative kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for sideløbende positive kontroller

— data i tabelform for hvert moderdyr, herunder: antal corpora lutea pr. moderdyr, antal implantationer pr. moderdyr, antal resorptioner og tab før implantation pr. moderdyr, antal levende implantater pr. moderdyr, antal døde implantater pr. moderdyr, fostrenes vægt

— sammenfatning af ovenstående oplysninger for hver parringsperiode og dosis med angivelse af frekvensen for dominerende dødelige virkninger

— anvendte statistiske analyser og metoder.

Diskussion af resultater

Konklusion

LITTERATUR

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

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) s. 235-334, Elsevier, Amsterdam.

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., og Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group »Dominant« lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185.

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. og Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. og Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. og Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. og Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., og Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. og Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. og Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., og Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. og Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. og Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. og Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. og Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. og Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. og Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. og Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. og Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. og Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. og Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. og Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., og Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. og Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

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

(28) Barrow M.V., Taylor W.J og Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. og Thybaud V. (2011). »Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data«, Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. og Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. og Johnson N. L. (Eds.), s. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. og Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston.

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Corpora luteum (lutea): den hormonudskillende struktur, der dannes på ovariet på det sted, hvor et follikel har løsnet et æg. Antallet af corpora lutea i ovarierne svarer til antallet af ovulerede æg.

Dominerende dødelig mutation: en mutation, der opstår i en kønscelle, eller som fikseres efter befrugtning, og som medfører embryon- eller fosterdød.

Fertilitetsgrad: antal parrede drægtige hunner divideret med antal parrede hunner.

Parringsinterval/-periode: tiden mellem eksponeringens afslutning og parringen af de behandlede hanner. Ved at styre dette interval/denne periode er det muligt at vurdere de kemiske virkninger på forskellige typer kønsceller. I mus er det ved parring i henholdsvis første, anden, tredje, fjerde, femte, sjette, syvende og ottende uge efter eksponeringens afslutning muligt at måle virkningerne i sperma, kondenserede spermatider, runde spermatider, pakyteniske spermatocytter, tidlige spermatocytter, differentierede spermatogonier, differentierende spermatogonier og stamcellespermatogonier.

Tab før implantation: forskellen mellem antallet af implantater og antallet af corpora lutea. Kan også estimeres ved at sammenligne det samlede antal implantater pr. hun i de behandlede grupper og kontrolgrupperne.

Tab efter implantation: andelen af døde implantater i den behandlede gruppe sammenlignet med andelen af døde implantater i forhold til det samlede antal implantater i kontrolgruppen.

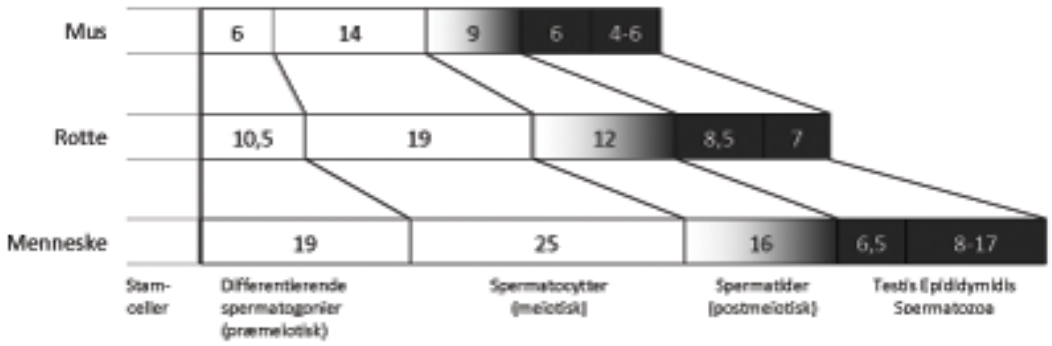
Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer.

▼**M8**

Tillæg 2

TIDSPUNKT FOR SPERMATOGENESE I PATTEDYR



Figur 1: Sammenligning af varigheden (i dage) af hanners kønscelleudvikling i mus, rotter og mennesker. Der sker ingen DNA-reparation i de perioder, der er skraveret.

Ovenfor vises et skema over spermatogenese i mus, rotter og mennesker (taget fra Adler, 1996). Udifferentierede spermatogonier omfatter: A-single, A-paired og A-aligned spermatogonier (Hess og de Franca, 2008). A-single anses for at være de ægte stamceller. Derfor skal der gå mindst 49 dage (i mus) mellem den sidste injektion af testkemikalie og parringen, hvis man vil vurdere virkningerne på stamceller.

Referencer

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

B.23. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode (TM) svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 483 (2016). Forsøgsmetoderne revideres regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling, skiftende reguleringsbehov og dyrevelfærdshensyn. Denne ændrede udgave af forsøgsmetoden afspejler mange års erfaring med dette assay og potentialet for testens integration i eller kombination med andre toksicitets- eller genotoksicitetsundersøgelser. Kombinerede toksicitetsundersøgelser har potentiale til at mindske det antal dyr, der anvendes i toksicitetstest. Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (1).

2. Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er at påvise, om et kemikalie forårsager strukturelle kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr (2) (3) (4). Derudover er testen relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responsen, selv om de kan være forskellige fra art til art. Denne forsøgsmetode er ikke beregnet til at måle antalsafvigelser. Assayet anvendes ikke rutinemæssigt til dette formål.

3. Ved denne test måles strukturelle kromosomaberrationer (af både kromosom- og kromatidtypen) i spermatogonier, der er ved at dele sig, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i disse kønsceller.

4. Definitioner af nøgletermer findes i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test, men andre arter kan i nogle tilfælde anvendes, hvis dette er videnskabeligt begrundet. Almindelige cytogenetiske præparater fra gnavertestikler skaber mitotiske (spermatogonier) og meiotiske (spermatocytter) metafaser. Mitotiske og meiotiske metafaser identificeres med udgangspunkt i kromosomernes morfologi (4). Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises strukturelle kromosomaberrationer i spermatogoniers mitose. Forsøgsmetoden omfatter ikke andre målceller.

6. For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier skal den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden disse aberrationer omdannes til aberrationer af kromosomtypen ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra behandlede spermatocytter ved meiotisk kromosomanalyse for strukturelle kromosomaberrationer ved diakinese-metafase I og -metafase II.

▼M8

7. Testiklerne (5) indeholder flere generationer af spermatogonier, og disse forskellige kønscelletyper kan udvise forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer en samlet respons fra behandlede spermatogonpopulationer. Størstedelen af de mitotiske celler i testikelpræparater er B-spermatogonier, som har en cellecyklus på ca. 26 timer (3).

8. Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til testiklerne, er denne test ikke egnet.

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

9. Normalt eksponeres dyrene for testkemikaliet ad en passende indgivelsesvej, og de aflives et passende tidsrum efter behandling. Inden aflivning behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter kromosompræparater af kønscellerne, som farves, og metafasecellerne analyseres for kromosomaberrationer.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

10. Laboratoriets kompetence til udførelse af dette assay bør fastslås ved dets påvisning af, at det kan frembringe de forventede resultater for frekvensen af strukturelle kromosomaberrationer i spermatogonier med positive kontrolstoffer (herunder svage responser) som dem, der er anført i tabel 1, og opnå negative kontrolfrekvenser, der er i overensstemmelse med en acceptabel mængde kontroldata i litteraturen (f.eks. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) eller eventuelt med laboratoriets historiske kontrolfordeling.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

11. Der bør anvendes sunde unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der benyttes sædvanligvis hanmus, men hanner af andre egnede pattedyrsarter kan ligeledes anvendes, når det er sagligt begrundet, og for at gøre det muligt at køre denne test sammen med en anden forsøgsmetode. Den saglige begrundelse for at bruge andre arter end gnavere bør anføres i rapporten.

Miljø og fodringsbetingelser

12. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 22 °C (±3 °C) for gnavere. Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højst fem dyr pr. bur), såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

▼M8

Klargøring af dyrene

13. Der anvendes normalt sunde unge voksne hanner (8-12 uger ved behandlingsstart), som udvælges vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres entydigt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Krydskontaminering mellem den positive kontrol og testkemikaliet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 %.

Fremstilling af doser

14. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og definerer hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser.

Testbetingelser – opløsningsmiddel/bærestof

15. Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke kunne reagere kemisk med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltopløsning, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. Hvis ikke der foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer strukturelle kromosomaberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastslå, om kontrollen med opløsningsmiddel/bærestof kan accepteres.

Positive kontroller

16. Der bør altid benyttes dyr til sideløbende positiv kontrol, medmindre laboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og på det seneste har anvendt testen rutinemæssigt (f.eks. inden for de sidste fem år). Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede objektglas). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrolforsøg (f.eks. hver 6.-18. måned) i det laboratorium, hvor testen udføres, f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

17. Positive kontrolstoffer bør frembringe en påviselig forøgelse af frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer over det spontane niveau. Der bør vælges sådanne doser i de positive kontroller, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Eksempler på positive kontrolstoffer findes i tabel 1.

▼M8

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolstoffer

Stoffer [CAS-nr.] (referencenr.)
Cyclophosphamidmonohydrat [CAS-nr. 50-18-0 (CAS-nr. 6055-19-2)] (9)
Cyclohexylamin [CAS-nr. 108-91-8] (7)
Mitomycin C [CAS-nr. 50-07-7] (6)
Monomer acrylamid [CAS 79-06-1] (10)
Triethylenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negative kontroller

18. Der bør ved hver prøvetagning indgå negative kontroldyr, som kun behandles med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandles på samme måde som behandlingsgrupperne. Hvis ikke der foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ikke medfører kromosomaberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der også indgå ubehandlede kontroldyr i hver prøvetagning for at fastslå, at kontrollen med bærestof kan accepteres.

FREMGANGSMÅDE

Antal dyr

19. Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem hanner pr. gruppe. Dette antal dyr pr. gruppe anses for at være tilstrækkeligt til at sikre passende statistisk styrke (generelt mulighed for påvisning af mindst en fordobling af frekvensen af kromosomaberrationer, når det negative kontrolniveau er på 1,0 % eller derover med 80 % sandsynlighed ved et signifikansniveau på 0,05) (3) (11). Vejledende vil en undersøgelse med to prøvetagningstidspunkter og tre dosisgrupper og en sideløbende negativ kontrolgruppe samt en positiv kontrolgruppe (som hver består af fem dyr) typisk højst kræve 45 dyr.

Behandlingsplan

20. Testkemikalier indgives normalt som enkeltdosis (dvs. som en enkelt behandling), men kan indgives efter andre doseringsskemaer, forudsat at de er sagligt begrundet.

21. I gruppen med højeste dosis udtages der prøver to gange efter behandling. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af testkemikaliet, og af testkemikaliets indvirkning på cellecyklussens kinetik, udtages der en tidlig prøve og en sen prøve ca. 24 og 48 timer efter behandling. For andre doser end den højeste dosis bør der udtages en tidlig prøve 24 timer efter behandling (mindre end eller lig med cyklustiden for B-spermatogonier for at optimere sandsynligheden for at score de første metafaser efter behandling), medmindre et andet prøvetagningstidspunkt er kendt som værende bedre egnet og mere berettiget.

22. Der kan udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan have S-uafhængige virkninger, kan tidligere prøvetagning (dvs. inden 24 timer) f.eks. være hensigtsmæssigt.

▼**M8**

23. Der kan benyttes en behandlingsplan med gentagne doser, f.eks. sammen med en test vedrørende et andet endepunkt, hvor der anvendes en 28-dages indgivelsesperiode (f.eks. TM B.58). Der skal dog anvendes yderligere grupper af dyr for at tilgodese de forskellige prøvetagningstidspunkter. Egnetheden af sådanne planer skal tilsvarende begrundes sagligt i hvert enkelt tilfælde.

24. Inden aflivning gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus og rotter er dette tidsrum ca. 3-5 timer.

Dosisniveauer

25. Hvis der gennemføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen, i henhold til anbefalingerne om gennemførelse af undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval (12). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den maksimalt tolererede dosis (MTD) defineret som den dosis, der medfører lette toksiske virkninger i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. unormal adfærd eller unormale reaktioner, mindre fald i kropsvægt eller cytotoksisk effekt i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver, at dyrene aflives (13).

26. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad fremkalder tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase). Dette lavere forhold må ikke overstige 50 %.

27. Testkemikalier med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra dosisfastsættelseskriterierne og bør evalueres individuelt.

28. For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe (punkt 18) og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke over 4. Hvis ikke testkemikaliet frembringer toksicitet i en forundersøgelse eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliet frembringer toksicitet, bør MTD imidlertid være den højeste indgivne dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvis dække et interval fra den højeste dosis til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (dvs. testiklen) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere. Hvis testkemikaliet frembringer toksicitet, bør grænsedosis plus to lavere doser (som beskrevet ovenfor) vælges. Grænsedosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover er 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, og for indgivelsesperioder på under 14 dage er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

▼M8

Indgivelse af doser

29. Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør tages i betragtning i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom foder, drikkevand, topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, som sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke, medmindre det er sagligt begrundet, da det normalt ikke er en fysiologisk relevant måde for human eksponering. Hvis testkemikaliet iblandes foder eller drikkevand, navnlig i forbindelse med enkeltdosering, bør det sikres, at tidsrummet mellem indtagelse af foder og drikkevand og prøvetagning er tilstrækkelig stort til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 33). Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen med sonde eller ved injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst må anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Testmængden bør variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Observationer

30. Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start og mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagne doser samt ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, bør vandindtaget måles ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikke-dødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (13).

Præparering af kromosomer

31. Umiddelbart efter aflivning udtages der kønscellesuspensioner fra en eller begge testikler, som eksponeres for hyptonisk væske og fikseres ifølge etablerede protokoller (f.eks. (2) (14) (15)). Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves (16) (17). Alle objektglas bør kodes, så den, der bedømmer dem, ikke kender deres identitet.

Analyse

32. Der bør scores mindst 200 velpræparerede metafaser pr. dyr (3) (11). Hvis den historiske negative kontrolfrekvens er < 1 %, bør der scores over 200 celler/dyr for at øge den statistiske styrke (3). Der bør anvendes farvningsmetoder, som gør det muligt at identificere centromeren.

33. Aberrationer af kromosom- og kromatidtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). Gaps bør registreres, men ikke tages i betragtning ved bestemmelsen af, hvorvidt et kemikalie fremkalder væsentlige stigninger i forekomsten af celler med kromosomaberrationer. De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af

▼M8

kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne dermed går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer på mindst $2n \pm 2$, hvor n er haploidtallet for kromosomer af den pågældende art.

34. Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere frekvensen af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer, hvis dette konstateres (jf. punkt 44).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

35. Data fra de enkelte dyr præsenteres i tabelform. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen klassificeret efter undertyper (brud, udvekslinger) bør anføres særskilt med antal og frekvens for forsøgs- og kontrolgrupperne. Gaps registreres særskilt. Frekvensen for gaps anføres, men medtages generelt ikke i analysen af den samlede frekvens for strukturel kromosomaberration. Procentdelen af polyploidi og celler med endofordoblede kromosomer rapporteres, når den observeres.

36. Data om toksicitet og kliniske tegn bør anføres (jf. punkt 30).

Acceptkriterier

37. Følgende kriterier bestemmer, om en test kan accepteres:

— Den sideløbende negative kontrol er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske negative kontroldata, som generelt forventes at være > 0 % og ≤ 1,5 % celler med kromosomaberrationer, og laboratoriets historiske kontroldata, hvis sådanne foreligger (jf. punkt 10 og 18).

— Sideløbende positive kontroller fremkalder responser, der er i overensstemmelse med offentliggjorte normer for historiske positive kontroldata eller laboratoriets historiske positive kontroldatabase, hvis en sådan foreligger, og medfører en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og 18).

— Et tilstrækkeligt antal celler og doser er blevet analyseret (jf. punkt 28 og 32).

— Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 25 og 26.

38. Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase som et mål for den cytotoksiske effekt på alle behandlede dyr og negative kontroldyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1 000 celler for hvert dyr.

Vurdering og fortolkning af resultater

39. Mindst tre behandlede doseringsgrupper bør analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til dosis/respons-analyse.

▼**M8**

40. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

— mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— stigningen er dosisafhængig i mindst en udtaget prøve, og

— et eller flere af resultaterne ligger uden for det acceptable interval for negative kontroldata eller fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for at kunne fremkalde kromosomaberrationer i forsøgsdyrenes spermatogonier. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (11) (18). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

41. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

— ingen af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— der ikke indtræder en dosisafhængig stigning ved en af forsøgsbetingelserne, og

— alle resultaterne ligger inden for det acceptable interval for negative kontroldata eller laboratoriets historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baseret kontrolgrænse på 95 %), hvis disse foreligger.

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde kromosomaberrationer i forsøgsdyrenes spermatogonier. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (11) (18). Et negativt resultat udelukker ikke, at kemikaliet kan fremkalde kromosomaberrationer på senere udviklingsstadier, som ikke indgår i undersøgelsen, eller genmutationer.

42. Der stilles ikke krav om verifikation af en klart positiv eller klart negativ respons.

43. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv, og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser på baggrund af eksisterende forsøgsdata, herunder undersøgelse af, om det positive resultat ligger uden for det acceptable interval for negative kontroldata eller laboratoriets historiske negative kontroldata (19).

44. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker.

45. En forøgelse af antallet af polyploide celler kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkalde kromosomantalsaberrationer (20). En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere cellecyklussens forløb (21) (22), hvilket er en anden måde at fremkalde kromosomantalsændringer på end ved inhibering af mitoseprocesser (jf. punkt 2). Forekomsten af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer bør derfor registreres særskilt.

▼M8

Testrapport

46. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Præparering af testkemikaliet:

— begrundelse for valg af bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet

— fastlæggelse af sammensætning af foder, drikkevand eller inhalationsformulering

— analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer), når disse foretages.

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— antal dyr og deres alder

— oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.

— metode til entydig identifikation af dyr

— for kortvarige undersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og afslutning. For undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

— positive og negative kontroldata (bærestof/opløsningsmiddel)

▼**M8**

— data fra en eventuel forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— begrundelse for indgivelsesvej

— oplysninger om præparering af testkemikaliet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— begrundelse for aflivningstidspunkter

— metoder til måling af dyretoksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt frekvensen for observationer og vejning af dyrene

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet er nået frem til målvævet eller det almindelige kredsløb, hvis der er opnået negative resultater

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og indtagelse, hvis relevant

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøvetagningsplaner samt begrundelser for valg

— aflivningsmetode

— analgesimetode (hvis anvendt)

— procedurer for isolering af væv

— det metafasestandsende kemikalies identitet og koncentration og behandlingens varighed

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for scoring af aberrationer

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker.

Resultater:

— dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— krops- og organvægt ved aflivning (hvis der benyttes flere behandlinger, kropsvægt under behandlingerne)

— tegn på toksicitet

— mitoseindeks

— forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiotiske metafase eller anden dokumentation for eksponering af målvævet

— antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelser

▼**M8**

— antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelser

— dosis/respons-forhold, hvor muligt

— anvendte statistiske analyser og metoder

— data for sideløbende negative kontroller

— historiske negative kontroldata med intervaller, gennemsnit, standardafvigelser og konfidensinterval på 95 % (hvor det er muligt) eller offentliggjorte historiske negative kontroldata, der anvendes til at bestemme, om testresultaterne kan accepteres

— data for sideløbende positive kontroller

— eventuelt observerede ploidiændringer, herunder frekvensen for polyploide og/eller endofordoblede celler.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

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

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt og J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. og Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. og de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, s. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. og Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, s. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., og Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., og Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. og Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. og Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. og Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. og Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., og Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. og Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. og Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. og Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. og Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. og Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Tillæg

DEFINITIONER

Aneuploidi: enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal for et eller flere kromosomer, men ikke for et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Centromer: region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene påhæftes under celledeling, således at datterkromosomerne kan bevæge sig korrekt i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kromosomdiversitet: kromosomformernes diversitet (f.eks. metacentrisk, akrocentrisk osv.) og størrelse.

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på – eller brud på og sammenføjning af – begge kromatider på samme sted.

Klastogen: alle kemikalier, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end bredden af et kromatid, og hvor forskydningen af kromatiderne er minimal.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejringer, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitoseindeks (MI): forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population. Viser populationens formeringsgrad.

Mitose: deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Antalsafvigelse: ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. $3n$, $4n$ osv.).

Strukturel aberration: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopisk undersøgelse i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, udvekslinger.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter og biologiske materialer.

▼M7

_____

▼B

B.25. **ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Ved test af arvelig translokation hos mus konstateres strukturelle og numeriske kromosomforandringer i pattedyrskønsceller udtrykt i førstegenerations afkom. Kromosomforandringerne, der måles, er reciprokke translokationer, og, når afkommet også omfatter hundyr, tab af et X-kromosom. Bærere af translokationer og XO-hunner har nedsat fertilitet, hvilket udnyttes ved udvælgelsen af F_1-afkom med henblik på cytogenetisk analyse. Visse typer translokationer (X-autosome og c-t-typen) forårsager fuldstændig sterilitet. Translokationer konstateres cytogenetisk i meiosens diakinese-metafase I hos hanner, som enten kan være af F_1-generationen eller sønner af F_1-hunner. XO-hunner identificeres cytogenetisk ved, at kromosomtallet i knoglemarvmitoser kun er 39.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Forberedelser

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Uopløselige stoffer opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Teststofopløsning anvendes umiddelbart efter fremstillingen. Hvis der anvendes et vehikel med henblik på at lette doseringen, må det ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Andre administrationsmåder kan være hensigtsmæssige.

Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr benyttes mus, idet disse giver de letteste betingelser med hensyn til avl og cytologisk verifikation. Der kræves ikke nogen bestemt stamme. Hvis det påregnes at teste fertiliteten, bør den anvendte stammes gennemsnitlige kuldstørrelse være over otte og relativt konstant.

Der anvendes sunde kønsmodne dyr.

▼B

Antal dyr

Det nødvendige antal dyr afhænger af den spontane translokationsfrekvens og den induktionsfrekvens, som er nødvendig for at opnå et positivt resultat.

Normalt gennemføres testen ved undersøgelse af F_1-hanner. Der undersøges mindst 500 F_1-hanner pr. dosis. Hvis der tillige anvendes F_1-hunner, undersøges 300 af hvert køn.

Negative og positive kontroller

Adækvate kontroldata, stammende fra sideløbende og historiske kontrolforsøg, skal være tilgængelige. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra undersøgelser foretaget for nyligt i det samme laboratorium, kan disse anvendes i stedet for en sideløbende positiv kontrol.

Dosisniveauer

Der testes en dosis, normalt den største dosis med minimal toksisk virkning, men uden indflydelse på reproduktion eller overlevelse. Hvis dosis-responsforholdet skal bestemmes, anvendes yderligere to mindre doser. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Eksponering og parring

Der kan anvendes to forskellige eksponeringsskemaer. I det hyppigst anvendte skema gives hele dosis på en gang. Teststoffet kan også gives syv dage om ugen i 35 dage. Antallet af parringer efter eksponeringen afhænger af eksponermgsskemaet og skal være stort nok til at sikre, at alle eksponerede kønscellestadier kan undersøges. Efter parringen placeres hunnerne i hver sit bur, Ved fødslen registreres dato, kuldstørrelse og afkommets køn. Alle hanner blandt afkommet vænnes fra og hunnerne frasorteres, medmindre de medtages i forsøget.

Test af heterozygoti efter translokation

Der anvendes en af to mulige metoder:

— fertilitetsundersøgelse af F_1-generationen med efterfølgende verifikation af mulige translokationsbærere ved hjælp af cytogenetisk analyse

— cytogenetisk analyse af alle F_1-hanner uden forudgående udvælgelse på grundlag af fertilitetsundersøgelser.

a) Fertilitetsundersøgelse

Nedsat fertilitet hos F_1-generationens medlemmer kan konstateres ved observation af kuldstørrelsen og/eller analyse af de parrede hundyrs uterusindhold.

Forinden fastlægges der kriterier for normal og nedsat fertilitet hos den anvendte stamme.

▼B

Observation af kuldstørrelse: De F_1-hanner, som skal undersøges, placeres i hver sit bur sammen med hunner fra samme forsøg eller fra bestanden. Fra og med 18 dage efter parringen iagttages burene dagligt. Kuldstørrelse og køn i F_2-generationen registreres ved fødslen, hvorefter kuldene fjernes. Hvis der testes F_1-hunner, bevares de små F_2-kuld med henblik på yderligere undersøgelser. Konstatering af, om hunner er translokationsbærere, forgår ved cytogenetisk analyse af translokation hos en vilkårlig han blandt deres afkom. XO-hunner identificeres gennem ændring af forholdet mellem hanner og hunner i deres afkom fra 1:1 til 1:2. Ved en sekventielt ordnet fremgangsmåde elimineres normale F_1-dyr fra den videre undersøgelse, hvis størreisen af det første F_2-kuld er lig med eller højere end en på forhånd fastsat normalværdi. I modsat fald observeres det andet eller tredje F_2-kuld.

F_1-dyr, der ikke kan klassificeres som normale efter observation af op til tre F_2-kuld underkastes enten yderligere undersøgelse ved analyse af de parrede hunners uterusindhold eller ved direkte cytogenetisk analyse.

Analyse af uterusindholdet: Den nedsatte kuldstørrelse hos translokationsbærere skyldes, at fostrene dør på det embryonale stade, så et stort antal døde implantater tyder på translokation hos forsøgsdyret. De F_1-hanner, som skal undersøges, parres hver især med to til tre hunner. Ved daglig undersøgelse mellem kl. 10 og 12 om formiddagen af forekomsten af vaginalprop, konstateres det, om befrugtning har fundet sted. Hunnerne aflives 14 til 16 dage senere, og antallet af levende og døde implantater i uteri registreres.

b) Cytogenetisk analyse

Der fremstilles testikelpræparater ved lufttørringsteknik. Translokationsbærere identificeres på grundlag af multivalente konfigurationer i primære spermatocytters diakinese-metafase I. Hvis der observeres mindst to celler med multivalente konfigurationer betragtes det som bevist, at forsøgsdyret er translokationsbærer.

Når der ikke gennemføres udvælgelse på basis af fertilitetsundersøgelser, undersøges alle F_1-hanner cytogenetisk. Der foretages mikroskopisk undersøgelse af mindst 25 diakinese-metafaser I pr. han. F_1-hanner med små testikler og defekt meiose, som standser før diakinesen, samt F_1-hunner, som formodes at være XO-bærere, underkastes undersøgelse af mitotiske metafaser i spermatogonier eller knoglemarv. Hvis der observeres usædvanlig lange og/eller korte kromosomer i ti celler, betragtes det som påvist, at der er tale om en translokation, som gør hanner sterile (c-t-typen). Visse X-autosome translokationer, som gør hanner sterile, kan kun identificeres ved båndanalyse af mitosekromosomer. Hvis der observeres 39 kromosomer i ti mitoser, betragtes det som påvist, at der er tale om en XO-hun.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse og kønsfordeling i forældregenerationens afkom ved fødslen og ved afvænningen angives for hver parringsperiode.

▼B

Med henblik på vurdering af F_1-dyrenes fertilitet anføres den gennemsnitlige kuldstørrelse efter de normale parringer og hver enkelt kuldstørrelse efter parring af F_1-translokationsbærere. Efter analyse af uterusindhold anføres det gennemsnitlige antal levende og døde implantater efter normale parringer og antallet af levende og døde implantater efter hver enkelt parring af F_1-translokationsbærere.

Efter cytogenetisk analyse af diakinese-metafaser I anføres antallet af multivalente konfigurationer og det totale antal undersøgte celler for hver enkelt translokationsbærer.

Det samlede antal parringer og parringsperiodernes længde anføres for sterile F_1-dyr. Der gives detaljerede oplysninger om testikelvægt og cytogenetisk analyse.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse, F_2-afkommets kønsfordeling og resultaterne af den cytogenetiske analyse anføres for XO-hunner.

Hvis mulige F_1-translokationsbærere udvælges ved fertilitetsundersøgelser, skal tabellerne indeholde oplysninger om, hvor mange af de udvalgte dyr der senere viste sig at være heterozygote efter translokation.

Data fra negative og positive kontrolforsøg rapporteres på lignende måde.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stamme, dyrenes alder, de doserede dyrs vægt

— antal af forældredyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupper

— forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af dyrenes behandling, dosisniveau, opløsningsmidler, parringsskema

— afkommets antal og køn for hver enkelt hun, antal og køn af afkom, som opdrættes med henblik på translokationsanalyse

— translokationsanalytiske kriterier og analysetidspunkt

— antal translokationsbærere samt detaljeret beskrivelse af disse, herunder avlingsdata og oplysninger om uterusindhold, hvis sådanne foreligger

— cytogenetisk fremgangsmåde og detaljerede oplysninger om den mikroskopiske analyse, helst vedlagt billeder

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

▼B

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.26. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE

1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksicitetstest svarer til OECD TG 408 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en længere periode, som dækker afvænning, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Metoden lægger yderligere vægt på virkninger på neurologiske områder og peger på virkninger på det immunologiske og reproduktive system. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget. Undersøgelsen skulle muliggøre identifikation af kemikalier med neurotoksiske virkninger og virkninger på det immunologiske og reproduktive system, som kan føre til yderligere dybdegående undersøgelser.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Dosis: Mængden af indgivet testkemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af testkemikalium i forhold til dyrets vægt (f.eks. mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

Dosering: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

NOAEL: Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosisniveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Testkemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret, og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene i mindst fem dage, og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer (kilde), køn, vægt og/eller alder. Dyrenes randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.2. **Fremstilling af doser**

Stoffet, der skal undersøges, indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Måden at indgive på afhænger af undersøgelsens formål og testmaterialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor muligt anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (f.eks. majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.4.3. **Testomstændighederne**

1.4.3.1. *Forsøgsdyrene*

Den foretrukne art er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Almindeligt anvendte laboratoriestammer af unge, sunde, voksne dyr bør anvendes. Hundyrene skal ikke have haft unger og ikke være gravide. Indgiften bør begynde snarest efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnittet for hvert køn. Når forsøget foretages som forløber for en længerevarende toksicitetsstudie, bør man i begge forsøg anvende samme stamme og fra samme kilde.

1.4.3.2. *Antal og køn*

Mindst 20 dyr (10 af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på ti dyr (fem af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

▼B

1.4.3.3. *Dosisstørrelse*

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.4.3.4). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde test-gruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis testkemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallelfodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af testkemikalium; virkningen på testkemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.4.3.4. *Grænsetest*

Et totalforsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænsetest er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dosisadministration**

Dyrene får testkemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Volumen bør ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt, undtaget vandige opløsninger, hvor man kan indgive 2 ml/100 g kropsvægt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i testvolumen begrænses ved justering af koncentrationen af testkemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

▼B

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når testkemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.2. **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i satellitgruppen, hvor man vil foretage »follow-up« -observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af undersøgelseslaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres, (men ikke som de eneste) er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, hårrejsning, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (1).

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet, passende udstyr bør udføres, før første gang testkemikaliet tilføres og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer, skal alle dyrene undersøges.

Hen imod slutningen af belastningsperioden og i hvert fald ikke tidligere end uge 11 foretages undersøgelser af reaktion på sensoriske stimuli af forskellig slags (1) (f.eks. auditoriske, visuelle og proprioceptive stimuli) (2), (3), (4), vurdering af gribestyrke (5) og af motorisk aktivitet (6). Nærmere detaljer af de procedurer, der kan foretages, findes i de respektive referencer. Andre, alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

Funktionsundersøgelser kan udelades nær forsøgets afslutning, hvis tilsvarende data kan findes i andre tilsvarende forsøg og de daglige kliniske undersøgelser ikke påviste funktionelle mangler.

▼B

Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på forgiftning i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

1.5.2.1. *Kropsvægt og føde/vandindtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis testkemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikkeaktiviteten kan ændres herved.

1.5.2.2. *Hæmatologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Følgende hæmatologiske undersøgelser bør foretages ved forsøgets afslutning, og når blodprøver bliver indsamlet undervejs: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentrationen, erytrocyttal, leukocyttal og differentialtælling, trombocyttal og koagulationstid/koagulationsevnen.

Klinisk biokemiske analyser, som kan vise toksisk virkning på væv, specielt på lever og nyrer, skal udføres på blodprøver taget fra alle dyrene lige før eller i forbindelse med aflivningen (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget). På samme måde, som gælder for hæmatologiske prøver, undersøges også blodprøver taget undervejs. Det anbefales at tage fastende blodprøver ([1]). Analyser på serum og plasma bør inkludere: natrium, kalium, glukose, total kolesterol, carbamid, BUN, kreatinin, total protein og albumin, og mere end to enzymer, der belyser den hepatocellulære effekt (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk fosfatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Derudover kan inkluderes måling af andre enzymer (fra lever eller andetsteds), galdesure salte, som kan give nyttig information i visse tilfælde.

I den sidste uge af forsøget kan eventuelt følgende urinanalyser udføres, idet timediuresen måles: udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

Yderligere bør man overveje at måle serummarkører for generel vævsskade. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliets egenskaber vides eller formodes at afficere beslægtede metaboliske markører, inkluderer calcium, fosfor, fastende triglycerider, specielle hormoner, methæmoglobin og kolinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor fødeindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Hvis blodprøver tages fastende, skal de tages efter udførelsen af de funktionelle observationer.

▼B

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

Hvis der ikke er tilstrækkeligt kendskab til de biokemiske eller hæmatologiske udgangsværdier, bør man overveje om disse analyser skal foretages, før belastningen begynder, men det anbefales almindeligvis ikke (7).

1.5.2.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyrene, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, uterus, ovarier, thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, tyreoidea og paratyreoidea, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger (bevaret ved indblæsning med fiksativ og påfølgende neddypning), aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, galdeblære (mus), lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud og øjne (hvis oftalmologisk undersøgelse viste ændringer), Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.2.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit«-gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal inkludere følgende informationer:

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende testkemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

▼B

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— resultater af oftalmologisk undersøgelse

— vurdering, hvis muligt, af sanseaktiviteter, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægtforholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt.

Diskussion af resultater

Konklusioner

3. **HENVISNINGER**

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

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologie Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad. S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in lndustrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser. V.C, Mc Daniel, K.M. Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C, Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L, Moser V.C, Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ IKKE-GNAVERE

1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksictetstest svarer til OECD TG 409 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en periode med hurtig vækst, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Undersøgelsesmetoder muliggør, at man på dyrearter, der ikke er gnavere, finder frem til negative virkninger ved belastning med kemikalier, og den bør kun bruges:

— hvor virkninger i andre undersøgelser peger på nødvendigheden af afklaring/karakterisering i en anden dyreart end gnavere, eller

— hvor toksiko-kinetiske undersøgelser peger på, at anvendelse af en speciel dyreart, der ikke er gnaver, er det mest relevante valg blandt laboratoriedyr, eller

— hvor andre specielle grunde retfærdiggør anvendelsen af dyrearter, der ikke er gnavere.

Se ligeledes den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Dosis: Mængden af indgivet testkemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af testkemikalium i forhold til dyrets vægt (f.eks. mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

Dosering: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

NOAEL: Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosisniveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Testkemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den hyppigst anvendte ikke-gnaverdyreart er hunden, som bør være af en veldefineret race; beagle-hunde er ofte anvendt. Af andre arter bruges f.eks. også grise og minigrise. Primater anbefales ikke, og brug af dem skal forsvares. Der skal anvendes unge, sunde dyr, og for hunde bør belastningen begynde fortrinsvis ved 4- til 6-månedersalderen og ikke senere end ved 9-månedersalderen. Når der er tale om et primærforsøg efterfulgt af et langtidsforsøg med kronisk toksicitet, bør man anvende samme dyreart i begge forsøg.

1.4.2. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Varigheden af tilvænning afhænger af den valgte dyreart og kilden. Mindst fem dage for hunde og grise, der er opdrættet til formålet og hører til i en stedlig koloni, men mindst to uger for disse dyr, hvis de kommer udefra. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer (kilde), køn, vægt og/eller alder. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.3. **Fremstilling af doser**

Stoffet, der skal undersøges, kan indgives via føden eller drikkevandet, ved hjælp af sonde eller i kapsler. Måden at indgive på gennem munden afhænger af undersøgelsens formål og testmaterialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor muligt anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (f.eks. majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Antal dyr og deres køn**

Mindst otte dyr (fire af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Antallet af dyr ved forsøgets afslutning må være tilstrækkelig stort, så evalueringen af den toksiske virkning er mulig. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på otte dyr (fire af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

▼B

1.5.2. **Dosisstørrelse**

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.5.3). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis testkemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallelfodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af testkemikalium; virkningen på testkemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.5.3. **Grænse-test**

Et totalforsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænsetest er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5.4. **Dosisadministration**

Dyrene får test-kemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i testvolumen begrænses ved justering af koncentrationen af testkemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

▼B

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når testkemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde eller kapsel, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.5. **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i »satellit«-gruppen, hvor man vil foretage »follow-up« -observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages, hvor det er praktisk muligt, uden for burene, på et standardareal og fortrinsvis på samme tid i hvert tilfælde. Man bør bestræbe sig på. at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres (men ikke som de eneste), er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, hårrejsning, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel skal også noteres.

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres, før test-kemikaliet tilføres første gang og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer. der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges.

1.5.5.1. *Kropsvægt og føde/vandindtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis test-kemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikkeaktiviteten kan ændres herved.

▼B

1.5.5.2. *Hæmalologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Hæmatologi, inkluderende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, tælling af røde og hvide blodlegemer, differentialtælling, trombocyttælling og et mål for koagulationsevnen, som f.eks. koagulationstid, protrombintid eller tromboplastintid, bør måles før forsøget påbegyndes, siden hver måned eller midtvejs i forsøget og endelig ved forsøgets afslutning.

Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle dyrene ved forsøgets begyndelse, siden enten hver måned eller midtvejs i forsøget og til sidst ved forsøgets afslutning. Man bør måle elektrolytbalancen, kulhydratstofskiftet og lever- og nyrefunktionen. Valg af særlige målinger vil afhænge af testkemikaliets virkningsmåde. Dyrene bør faste, afhængig af dyrearten, før blodprøvetagningen. Det foreslås, at man måler calcium, fosfor, klorid, kalium, natrium, fastende glukose, alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, ornitin decarboksylase, gammaglutamyl transpeptidase, carbamid, albumin, serumkreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Urinanalyser bør udføres i hvert fald ved begyndelsen, midtvejs og ved afslutningen af forsøget, med opsamling af timediuresen. Analyserne inkluderer udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller. Andre parametre kan inkluderes, hvor man finder det nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

Herudover bør man overveje måling af markører for generel vævsskade. Andre målinger, som kan være nødvendige for en tilstrækkelig toksikologisk vurdering, inkluderer analyser af lipider, hormoner, syre/base-balancen, methæmoglobin, og hæmning af kolinesterasen. Hvor det skønnes nødvendigt, kan andre biokemiske målinger inddrages for at udvide undersøgelsen af observerede virkninger. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

1.5.5.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever med galdeblære, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, ovarier, uterus, tyreoidea med paratyreoideae. thymus, milt hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

▼B

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, øjne. tyreoidea, paratyreoideae, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, galdeblære, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger, aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.5.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på i hvert fald alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelsen skal omfatte alle dyrene i de andre gruppe også, hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit« -gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden: det antal dyr. der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal inkludere følgende informationer:

▼B

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende test-kemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— oftalmologisk undersøgelse

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægtforholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt

Diskussion af resultater

Konklusioner

▼B

B.28. **SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN — 90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Teststoffet påføres dagligt huden på grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt gradueret dosis til hver gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i forsøgsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. De dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i grupper. Kort før forsøget indledes, klippes pelsen på ryggen på forsøgsdyrene. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning eller barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af dyrets overflade skal kunne anvendes til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område, der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Der skal anvendes daglig applikation fem til syv dage ugentligt.

1.6.2. ***Forsøgsbetingelser***

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer, For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at variationen i deres vægt ikke må overskride ± 20 % af en rimelig gennemsnitsvægt. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

▼B

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (10 hunner og 10 hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på 20 dyr (10 af hvert køn) for den højeste koncentration i 90 dage og gennem en periode på 28 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller sent opståede toksiske virkninger.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er på mindst seks timer dagligt. Teststoffet påføres på omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (én gang eller to gange om ugen), så de er konstante i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra påføring af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, bør koncentrationen sænkes, og der kan derved ske en reduktion eller et fuldstændigt bortfald af de øvrige toksiske effekter på den højeste dosis. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afbryde forsøget og foretage et nyt forsøg med en lavere koncentration.

1.6.3. Grænsetest

Hvis et dosisniveau på 1 000 mg/kg legemsvægt eller et højere dosisniveau fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, mennesker udsættes for, ikke giver nogen toksisk virkning, kan yderligere forsøg betragtes som unødvendige.

1.6.4. Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkt for toksicitetstegns optræden og forsvinden skal registreres.

▼B

1.6.5. Fremgangsmåde

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Den ideelle doseringer påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 90 dage.

Eventuelle satellitgrupper beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at påføringen af teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger er reversible eller om de persisterer. Ekspositionsperioden skal være seks timer dagligt.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så det sikres, at dyrene ikke indtager teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet, men man bør ikke immobilisere dem fuldstændigt.

Ved eksponeringsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgrupperne. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes normalt følgende undersøgelser:

a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden påføring af teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der påføres den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, skal alle dyrene undersøges.

b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringsevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.

▼B

c) Klinisk biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke test afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Hvis historiske basaldata er inadækvate, skal man gøre sig overvejelser over anvendelsen af hæmatologiske og klinisk biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektion for at undgå udtørring, Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, (trakea), lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, galdeblære (hvis den findes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), (sternum med benmarv), (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler). Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer.

Histopatologiske undersøgelser

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis.

b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.

▼B

c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.

d) Når der anvendes rotter, undersøges lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper histopatologisk med henblik på konstatering af tegn på infektion, idet dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis, skal altid undersøges.

e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion, Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning

— toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— oftalmologiske fund

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater

— klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)

— obduktionsfund

▼B

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼M4

B.29. **SUBKRONISK TOKSICITET (INHALATION): 90-DAGES FORSØG**

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.29 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliets toksicitet ved inhalation i en subkronisk varighed (90 dage) og at fremskaffe robuste data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af 10 hangnavere og 10 hungnavere eksponeres i seks timer om dagen i 90 dage (13 uger) for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehikelkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), aflivninger under forsøget, bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 413 (2009). Den oprindelige Test Guideline 413 (TG 413) for subkronisk toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.29 (som svarer til den reviderede TG 413) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.

2. Forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation bruges primært til at fastlægge lovgivningsmæssige koncentrationer med henblik på at vurdere risici for arbejdstagere på arbejdspladsen. De bruges også til at vurdere risikoen for mennesker i boliger, ved transport og miljøet. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 90 dage (ca. 10 % af en rottes levetid). Data, der udledes af forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger og til udvælgelse af koncentrationer til kroniske forsøg. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.

▼M4

4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad. Se GD 39 (2) for yderligere oplysninger. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.

5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet i forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

Forberedelse af dyrene

7. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

Dyreopdræt og -sundhed

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

▼M4

Inhalationskamre

9. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG

Grænsekoncentrationer

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekoncentrationer i forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskoncentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskoncentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Det gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekoncentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

Dosisbestemmende forsøg

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, er det oftest nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-koncentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødig belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.

12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Afhængigt af de valgte effektparametre eksponeres 3-6 hanner og 3-6 hunner ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 28 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-koncentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

▼M4

13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfaters hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner (T_3, T_4) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

Hovedforsøg

14. Hovedforsøget vedrørende subkronisk toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 18). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringssniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processeer). Hver testgruppe består af 10 hangnavere og 10 hungnavere, der eksponeres for testkemikaliet i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på 13 uger (samlet forsøgsvarighed på mindst 90 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

15. De valgte målkoncentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:

— Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.

— De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graduerede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.

— Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ringe eller ingen toksisk virkning.

Aflivninger under forsøget

16. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør antallet af dyr på hvert eksponeringsniveau forøges med det antal dyr, der aflives, inden forsøget afsluttes. Der gives en begrundelse for aflivning under forsøget, og der redegøres for aflivningerne i statistiske analyser.

▼M4

Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)

17. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af 10 hanner og 10 hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikaliet ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikelkontrolgrupper (se afsnit 18).

Kontroldyr

18. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikaliet. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontroldyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

19. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformige materialer kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

Partikelstørrelsesfordeling

20. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 μm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

▼M4

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

21. Ideelt testes testkemikaliet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikaliet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

22. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås. Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

23. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

24. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

25. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet målt ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver

▼M4

dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.

26. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

27. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret (t_{95}) og henfald. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).

28. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

29. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.

▼M4

30. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.

31. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

32. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslanger på dyrene, dårligt belyste helkropskamre eller uigennemsigtige atmosfære, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.

33. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

34. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, bioovervågning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdsændringer.

KROPSVÆGT

35. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første fire uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionsperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

36. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

▼M4

KLINISK PATOLOGI

37. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).

38. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactatdehydrogenase, sorbitaldehydrogenase, glutamatdehydrogenase og γ-glutamyltranspeptidase).

Tabel 1

Standardparametre for klinisk patologi

Hæmatologisk undersøgelse	
Erythrocyttælling	Leukocyttal
Hæmatokrit	Differentialtælling
Hæmoglobinkoncentration	Trombocyttal
Middelcellehæmoglobin	Koaguleringsevne (vælg én):
Middelcellevolumen	— protrombintid
Middelcellehæmoglobinkoncentration	— koaguleringstid
Retikulocyttælling	— partiel tromboplastintid

Klinisk-kemisk undersøgelse	
Glukose (*)	Alanin-aminotransferase
Total kolesterol	Aspartat-aminotransferase
Triglycerider	Alkalisk fosfatase
BUN	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Total protein	Fosfor
Albumin	Chlorid
Globulin	

Urinanalyse (valgfri)	
Udseende (farve og turbiditet)	Total protein
Volumen	Glukose
Specifik vægtfylde eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den tilpasses den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde samme med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).

▼**M4**

39. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocyttal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indicerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylning findes i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSØGELSE

40. Ved hjælp af et oftalmoskop eller et tilsvarende instrument foretages oftalmologiske undersøgelser af fundus, refraktionsmedier, iris og conjunctivae for alle dyr inden administration af testkemikaliet og for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkoncentration ved forsøgsafslutning. Hvis der observeres forandringer i øjnene, undersøges alle dyr i de andre grupper, herunder satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

41. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

42. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

▼M4

Tabel 2

Organer og væv, der præserveres under makroskopisk obduktion

Binyrer	Øsofagus
Aorta	[Bulbus olfactorius]
Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat)	**Æggestokke**
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Bugspytkirtler
Cæcum	Paratyreoideae
Tyktarm	Perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen
Duodenum	Hypofyse
[**Bitestikler**]	Prostata
[Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg]	Rectum
Femur og knæled	Spytkirtler
Galdeblære (hvis en sådan forefindes)	Vesiculae seminales
[Harderian-kirtler]	Hud
Hjerte	Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal)
Ileum	**Milt**
Jejunum	Sternum
Nyrer	Mavesæk
[Tårekirtler (ekstraorbitale)]	Tænder
Larynx (3 niveauer, herunder basis af strubelåget)	**Testikler**
Lever	**Brisler**
Lunge (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier)	**Skjoldbruskkirtlen**
Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtopløselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder.	Tunge
Lymfeknuder (distale fra indgangssted)	Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit)
Brystkirtler (hundyr)	[Ureter]
Muskel (lår)	[Urethra]
Nasopharyngeale væv (mindst 4 niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal-kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	[Urinblære]
	Uterus
	Målorganer
	Alle større læsioner og masser

▼M4

43. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskylning, udtages en ikkeskyllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).

44. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5) (6) (7) (8) (9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT) (10) (11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

45. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkoncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højekspone-ringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og tilfældige resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

Testrapport

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

▼M4

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

— detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— behandling af tilført/udledt luft

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

▼M4

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m^3 osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet;

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

▼M4

— opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt

— opstilling i tabelform af foderindtagelse

— opstilling i tabelform af kliniske patologiske data

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

Diskussion og fortolkning af resultater

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

— Målorganet (-organerne) identificeres.

— NOAEL og LOAEL bestemmes.

LITTERATUR:

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

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

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

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

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

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

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

(13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

B.30. **FORSØG VEDRØRENDE KRONISK TOKSICITET**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 452 (2009). Den oprindelige TG 452 blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.30 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og myndighedsbestemmelser (1) (2) (3) (4). Denne testmetode B.30 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier.

2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (5), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (6).

3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet. Langvarige forsøg vedrørende kronisk toksicitet, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (6) (7) og dermal applikation (6). Kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (7) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (10) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en betydelig del af de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, peger på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet

— identifikation af målorganer

— karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (6).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af de toksikologiske karakteristika for et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for kronisk toksicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, informationer om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til kroniske test som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (11) (12) (13) (14).

8. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (6) og Guidance Document No. 35 (15).

▼M4

9. Når et forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (16), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.

10. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (6) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (17) (18). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 11).

11. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (denne testmetode B.30) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 9 og 20-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.

12. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (6).

TESTENS PRINCIP

13. Testkemikaliet administreres dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 33). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Testkemikaliet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 19). I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

14. Denne testmetode omhandler primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet hos gnavere (se afsnit 2), selv om det anerkendes, at lignende forsøg på ikke-gnavere kan være påkrævet i medfør af lovgivningen. Valget af dyreart skal begrundes. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (5). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

15. Den foretrukne art i denne testmetode er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Opbevaring og fodringsbetingelser

16. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

17. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte

▼M4

dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

18. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der ved afslutningen af forsøget er tilstrækkeligt mange dyr i hver gruppe til at foretage en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hvis der anvendes gnavere, skal der normalt anvendes mindst 20 dyr pr. køn pr. gruppe til hvert dosisniveau. Hvis der anvendes ikke-gnavere, anbefales mindst 4 dyr pr. køn pr. gruppe. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser.

Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgrupper og sentineldyr

19. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget (mindst 10 dyr/køn/gruppe), f.eks. ved 6 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af toksikologiske virkninger og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (22). Hvis aflivninger eller inklusion af satellit- eller sentinelgrupper planlægges undervejs i forsøget, skal antallet af dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Disse dyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

Dosisgrupper og dosering

20. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (6). Mindst tre dosisniveauer og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se afsnit 27). Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

▼M4

21. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges normalt det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 22, vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %).

22. Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt. Den højeste dosis bør ikke overstige 1 000 mg/kg kropsvægt/dag (grænsedosis, se afsnit 27).

23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.

24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

25. Som yderligere beskrevet i Guidance Document No. 116 (6) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.

▼M4

26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret foderindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

27. Hvis det ud fra informationer fra forforsøg kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag og de fremgangsmåder, der er beskrevet for dette forsøg, næppe vil fremkalde negative virkninger, og hvis toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

28. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (6). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

29. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

30. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

31. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (se også afsnit 33), men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene. Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (10), i en periode på 12 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (8).

32. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Det maksimale væskevolumen, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (22). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.

Forsøgets varighed

33. Denne testmetode er primært designet som et 12-måneders forsøg vedrørende kronisk toksicitet, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. 6 eller 9 måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering. Yderligere oplysninger, herunder overvejelser om overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

OBSERVATIONER

34. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.

▼M4

35. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Undersøgelserne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (24).

36. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliet. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.

37. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (24) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (25), (26), (27), gribestyrke (28) og motorisk aktivitet (29) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

38. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

39. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

▼M4

Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver

40. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder), og de samme dyr anvendes i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 18). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.

41. Følgende parametre bør undersøges (30): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikaliet har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocyttællinger og knoglemarvcytologi også være indiceret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.

42. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser og med anvendelse af de samme dyr i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. fire dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør faste inden blodprøvetagning. Følgende parametre bør undersøges (30): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, kalcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdesyrer) (31) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5′-nucleotidase, total bilirubin og totale galdesyrer) (31). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.

▼M4

43. Urinanalyser udføres på mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved 3 måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgik i en ekspertanbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (30): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

44. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (30). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 50) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

Patologi

Makroskopisk obduktion

45. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 19). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentineldyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.

46. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 45. Binyrer, hjerne, bitestikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejet efter fiksering, med paratyreoideae) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. I forsøg med mus er vejningen af binyrer valgfri.

47. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 32) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]

▼M4

Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Luftrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculae seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserveres, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

48. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (32). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter

— målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

Data

49. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

50. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør være indgivet fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme og være genereret inden for fem år forud for det aktuelle forsøg.

51. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 8). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

Testrapport

52. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, køn og alder ved forsøgets begyndelse

▼M4

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt

— data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene

— art, incidens (og, hvis vurderet sværhedsgrad) og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— oftalmologisk undersøgelse

— hæmatologiske målinger

— klinisk-biokemiske målinger

— urinanalyser

— resultat af undersøgelser af neurotoksicitet eller immunotoksicitet

— kropsvægt ved forsøgets afslutning

— organvægt (og deres forhold, hvis relevant)

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes.

▼M4

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

— forhold mellem dosis og respons

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— diskussion af tilgange til modellering

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— historiske kontroldata

— relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

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

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

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

(5) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

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

(8) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakaut toksicitet (inhalation), 28-dages forsøg.

(9) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg.

(10) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

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

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

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

▼M4

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

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

(16) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.

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

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

(19) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

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

(31) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

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

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.31. **PRÆNATAL UDVIKLINGSTOKSICITETSUNDERSØGELSE**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG (2001).

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode til udviklingstoksicitetsundersøgelse er at skaffe generel information om virkningerne af prænatal eksponering på det drægtige forsøgsdyr og på organismen, mens den udvikles in utero; heri kan også indgå en vurdering af maternel påvirkning såvel som død, strukturabnormiteter og ændret vækst af fosteret. Skønt funktionelle mangler er en vigtig del af udviklingen, indgår de ikke i denne forsøgsmetode. Funktionelle mangler kan i stedet undersøges i et særskilt forsøg eller ved at denne undersøgelse suppleres med anvendelse af metoden til undersøgelse af udviklingsneurotoksicitet. Til undersøgelse for funktionelle mangler og andre postnatale effekter kan anvendes metoderne fra reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer og udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse.

Denne metode kan kræve individuel tilpasning på grundlag af konkret viden om f.eks. teststoffets fysisk-kemiske eller toksikologiske egenskaber. En sådan tilpasning kan godtages, når det på overbevisende måde videnskabeligt dokumenteres, at tilpasningen vil gøre forsøget mere informativt. I sådanne tilfælde skal denne videnskabelige dokumentation være nøje beskrevet i forsøgsrapporten.

1.2. DEFINITIONER

Udviklingstoksikologi: Undersøgelse af de ugunstige virkninger på organismens udvikling, som kan forårsages af eksposition før konceptionen, under den prænatale udvikling og posnatalt i tiden indtil kønsmodning. Hovedmanifestationerne af toksisk virkning på udviklingen er 1) organismens død, 2) strukturabnormiteter, 3) ændret vækst og 4) funktionelle mangler. Udviklingstoksikologi er tidligere hovedsagelig blevet betegnet teratologi.

Negativ virkning: Enhver sådan behandlingsrelateret afvigelse fra grundlinjen, som forringer en organismes overlevelsesevne, reproduktionsevne eller tilpasningsevne til omgivelserne. Udviklingstoksikologi omfatter i bredeste forstand enhver virkning, som interfererer med den normale udvikling af conceptus både før og efter fødslen.

Ændret vækst: Ændring i afkommets organ- eller kropsvægt eller -størrelse.

Forandringer (abnormiteter): Strukturelle forandringer i udviklingen, herunder både misdannelser og afvigelser (28).

Misdannelse/væsentlig abnormitet: Strukturforandring, som anses for skadelig for dyret (og kan være dødelig), og som sædvanligvis er sjælden.

▼B

Afvigelse/mindre abnormitet: Strukturændring, som anses for at have ingen eller ringe skadelig virkning for dyret; kan være forbigående og kan optræde forholdsvis hyppigt i kontrolpopulationen.

Conceptus: Det samlede produkt af et befrugtet æg på ethvert stadium af udviklingen fra befrugtning til fødsel, herunder ekstraembryonale membraner samt selve embryo eller føtus.

Implantation (nidation): Fasthæftning af blastocysten til det indvendige epitel i uterus, herunder penetration af uterusepitelet og indlejring i endometriet.

Embryo: Organismens tidlige stadium eller udviklingsstadium, specielt det fremvoksende produkt af æggets befrugtning, efter at længdeaksen viser sig, og indtil alle hovedstrukturer er til stede.

Embryotoksisk: Skadelig for den normale struktur, udvikling, vækst og eller levedygtighed af et embryo.

Føtus: Det ufødte afkom i den postembryonale periode.

Føtotoksicitet: Skadevirkning på den normale struktur, udvikling, vækst og eller levedygtighed af et føtus.

Abort: Præmatur udstødelse fra uterus af konceptionsprodukter, dvs. af embryonet eller af et ikke levedygtigt føtus.

Resorption: Et conceptus, som efter at have være implanteret i uterus er dødt og er ved at blive resorberet eller er blevet det.

Tidlig resorption: Tegn på implantation uden genkendeligt embryo/føtus.

Sen resorption: Et dødt embryo eller føtus med ydre degenerative forandringer.

NOAEL: forkortelse for »no-observed-adverse-effect level«, dvs, den højeste dosis eller det højeste eksponeringsniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede negative virkninger.

1.3. REFERENCESTOF

Intet.

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Teststoffet administreres normalt til drægtige dyr, i det mindste fra implantationsdagen til én dag før planlagt aflivning, som bør finde sted så kort som muligt før det forventede fødselstidspunkt, uden at der er risiko for tab af data som følge af for tidlig fødsel. Det er ikke hensigten, at metoden alene skal omhandle organogeneseperioden (f.eks. dag 5-15 hos gnavere og dag 6-18 hos kaniner), men, når det er hensigtsmæssigt, også virkninger fra præimplantationsperioden gennem hele drægtighedsperioden indtil dagen før kejsersnit. Kort inden kejsersnittet aflives hundyrene, uterusindholdet undersøges, og føtus bedømmes for synlige udvendige abnormiteter og bløddels- og skeletforandringer.

▼B

1.5. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.5.1. **Valg af dyreart**

Det anbefales, at forsøget udføres i den mest relevante dyreart, og at de anvendte laboratoriedyr er af arter og stammer, som sædvanligvis benyttes til teratogenicitetsforsøg. Den foretrukne art gnavere er rotter, og den foretrukne art ikke-gnavere er kaniner. Anvendes andre dyrearter, bør dette begrundes.

1.5.2. **Omgivende miljø og fodring af dyrene**

Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C) for gnavere og 18 °C (± 3 °C) for kaniner, Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % undtagen under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand,

Parring bør finde sted i bure egnede til formålet. Par bør fortrinsvis holdes for sig, men gruppevis anbringelse af få dyr kan også godtages.

1.5.3. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst fem døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og/eller alder. Dyrene i alle forsøgsgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder, På hvert dosisniveau skal anvendes unge voksne hundyr, som ikke tidligere har født. Hunnerne parres med hanner af samme art og stamme, idet parring af søskendedyr undgås. For gnavere er drægtighedsperiodens dag 0 den dag, hvor der observeres en vaginal prop og/eller semen; for kaniner er dag 0 sædvanligvis dagen for coitus eller for kunstig insemination, hvis denne teknik anvendes. De parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgruppeme. Burene arrangeres således, at eventuelle virkninger af burenes placering minimeres. Hvert dyr tilordnes et unikt identifikationsnummer. Parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne, og hvis hunnerne parres holdvis, skal dyrene i hvert hold fordeles ligeligt mellem grupperne. Tilsvarende skal hunner, som insemineres af samme han, fordeles jævnt mellem grupperne.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Dyrenes antal og køn**

I hver behandlings- og kontrolgruppe skal der være tilstrækkeligt med hunner til, at der ved obduktion fås ca. 20 hundyr med implantationssteder. Hvis der færre end 16 dyr med implantationssteder i en gruppe, kan det blive anset for utilstrækkeligt. Mortalitet af moderdyrene gør ikke nødvendigvis undersøgelsens resultater ugyldige, forudsat at den ikke er over ca. 10 %.

▼B

1.6.2. **Tilberedning af doser**

Anvendes et vehikel eller andet tilsætningsstof, skal følgende egenskaber tages i betragtning: Indvirkningen på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention eller udskillelse; eventuel sådan indvirkning på teststoffets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske egenskaber, samt indvirkningen på dyrenes føde- og vandindtagelse eller ernæringstilstand, Vehiklet må hverken være udviklingstoksisk eller påvirke reproduktionen.

1.6.3. **Dosering**

Normalt administreres teststoffet dagligt fra implantationstidspunktet (f.eks. dag 5 efter parring) til dagen inden det planlagte kejsersnit. Hvis eventuelle indledende undersøgelser ikke tyder på et stort potentiale for præimplantationstab, kan behandlingen udvides til at omfatte hele drægtighedsperioden fra parringen til dagen før den planlagte aflivning. Det er velkendt, at uhensigtsmæssig behandling eller stress i drægtighedsperioden kan medføre prænatalt tab. For at sikre mod prænatalt tab som følge af ikke-behandlingsrelaterede faktorer skal man undgå unødvendig håndtering af drægtige dyr samt stress forårsaget af ydre faktorer som støj.

Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Raske dyr skal fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne. Dosisniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes en gradueret toksisk effekt. Medmindre doseringen må begrænses pga. teststoffets fysisk-kemiske eller biologiske egenskaber, vælges den højeste dosering således, at den har en vis udviklingstoksisk effekt og/eller toksisk effekt på moderdyret (kliniske symptomer eller vægttab), men uden at den forårsager død eller alvorlige lidelser. Der skal være mindst ét mellemniveau, som fremkalder det laveste observerbare niveau af toksisk effekt. Den laveste dosering må hverken medføre tegn på materiel toksicitet eller udviklingstoksicitet. Der vælges en aftagende række dosisniveauer. som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons samt det niveau, som ikke medfører tegn på skadelig effekt (NOAEL). Ved fastlæggelse af den aftagende række dosisniveauer svarer de optimale intervaller ofte til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. Skønt målet er at fastlægge en maternel NOAEL, kan undersøgelser, hvor en sådan dosis ikke fastlægges, også være acceptable (1).

Doseringen vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitetsdata samt supplerende oplysninger om metabolisme og toksikokinetik af teststof eller beslægtede stoffer. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre det hensigtsmæssige i den valgte dosering.

Der skal være en sideløbende kontrolgruppe. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af teststoffet. Alle grupper skal modtage samme volumen af enten teststof eller bærestof. Dyrene i kontrolgruppen (-grupperne) skal håndteres på samme måde som behandlingsgruppen. Kontrolgrupper på vehikel skal modtage dette i den største mængde, det anvendes i (som til behandlingsgruppen på laveste dosis).

▼B

1.6.4. **Grænseprøve**

Såfremt et oralt testdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/døgn med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbar toksisk virkning i de drægtige dyr eller deres afkom, og såfremt foreliggende data (f.eks. fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser) ikke giver anledning til at forvente nogen virkning, skal et komplet forsøg med tre dosisniveauer ikke absolut anses for nødvendigt. Den påregnede eksponering af mennesker kan tilsige, at der anvendes et højere oralt dosisniveau end det. der er anvendt i grænseforsøget. For andre administrationsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for og begrænse det maksimale opnåelige ekspositionsniveau (f.eks. må dermal applikation ikke forårsage alvorlige lokale toksiske virkninger).

1.6.5 **Administration af doser**

Teststoffet administreres sædvanligvis oralt med sonde. Anvendes anden administrationsvej, skal forsøgslederen begrunde valget, og passende modifikationer kan være nødvendige (2)(3)(4). Teststoffet bør administreres på omtrent samme tidspunkt hver dag.

Doseringen til det enkelte dyr bør normalt baseres på den seneste bestemmelse af dyrets vægt. I drægtighedsperiodens sidste trimester må justering af doseringen dog ske med varsomhed. Doseringen bør på grundlag af foreliggende data vælges, så man undgår kraftig maternel toksicitet, Konstateres der kraftig toksisk effekt i de behandlede moderdyr, skal disse aflives af humane grunde. Viser flere drægtige dyr tegn på stærk toksicitet, bør man overvejs at indstille forsøget for den pågældende dosisgruppe. Administreres stoffet med sonde, bør dette fortrinsvis ske som enkeltdosis ved hjælp af gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendes majsolie som vehikel, må volumenet ikke overstige 0,4 ml/100 g kropsvægt. Variationer i testvolumen skal ved justering af koncentrationerne minimeres, så der sikres et konstant volumen for alle dosisgrupper.

1.6.6. **Iagttagelse af moderdyrene**

Klinisk observation skal foretages og registreres mindst én gang dagligt, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag, idet man retter sig efter tidspunktet for den forventede maksimale effekt af indgivelsen. Dyrenes tilstand registreres, herunder dødelighed, moribund tilstand, væsentlige adfærdsændringer og alle tegn på åbenbar toksicitet.

1.6.7. **Kropsvægt og fødeindtagelse**

Dyrene vejes på drægtighedsperiodens dag 0 eller, for tidsparrede dyr leveret fra en ekstern opdrætter, på den første dag i doseringsperioden, og derefter mindst hver tredje dag i doseringsperioden samt på dagen for den planlagte aflivning.

▼B

Fødeindtagelsen registreres med tre dages mellemrum, hvilket skal falde sammen med kropsvægtbestemmelsen.

1.6.8. **Post-mortem undersøgelse**

Hunnerne aflives ét døgn for den forventede fødsel. Hunner, som inden den planlagte aflivning viser tegn på abort eller for tidlig fødsel, aflives og underkastes grundig makroskopisk undersøgelse.

Ved forsøgets slutning eller ved indtræden af død under forsøget undersøges moderdyret makroskopisk for eventuelle strukturabnormiteter eller patologiske forandringer. Vurderingen af hundyrene under kejsersnittet og de efterfølgende undersøgelser af føtus bør fortrinsvis ske uden kendskab til behandlingsgruppen for at minimere skævhed.

1.6.9. **Undersøgelse af uterusindholdet**

Umiddelbart efter undersøgelsens afslutning eller snarest muligt efter dødens indtræden udtages uterus, og dyrenes drægtighedsstatus fastslås. Uteri, som fremtræder ikke-gravide, undersøges nærmere (f.eks. med ammoniumsulfidfarvning til gnavere og Salewski-farvning som en velegnet alternativ metode til kaniner) med henblik på bekræftelse af den ikke-gravide status (5).

De gravide uteri inklusive cervix vejes. Vægten af den gravide uterus skal ikke bestemmes for dyr, som findes døde i løbet af undersøgelsen.

Antal corpora lutea hos drægtige dyr bestemmes.

Uterusindholdet undersøges for antal døde embryoner eller føtus samt levende fostre, Resorptionsgraden beskrives, for at det relative dødstidpunkt for conceptus skønsvis kan fastsættes (se punkt 1.2).

1.6.10. **Undersøgelse af føtus**

For hvert føtus bestemmes køn og kropsvægt.

Hvert føtus undersøges for ydre forandringer (6).

Føtus undersøges for skelet- og bløddelsforandringer (f.eks. variationer, misdannelser og abnormiteter) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Det må foretrækkes, at føtale forandringer kategoriseres, men dette er ikke et krav. Har kategorisering fundet sted, skal det klart angives, efter hvilke kriterier hver kategori er fastlagt. Særlig opmærksomhed skal udvises over for reproduktionssystemet, som skal undersøges for tegn på forandringer i udviklingen.

For gnavere skal ca, halvdelen af hvert kuld præpareres og undersøges for skeletforandringer. Den resterende del præpareres og undersøges for bløddelsforandringer med anerkendte eller egnede metoder til seriesnit eller omhyggelig makroskopisk dissektion.

▼B

For ikke-gnavere, f.eks. kaniner, skal alle fostre undersøges for både bløddels- og skeletforandringer. Disse fostre vurderes for bløddelsforandringer ved omhyggelig dissektion. herunder også metoder til nærmere vurdering af hjertets indvendige struktur (25). Hovedet på halvdelen af de således undersøgte fostre fjernes og præpareres til undersøgelse af bløddelsforandringer (herunder øjne, hjerne, næsesvælg og tunge), idet der anvendes sædvanlige seriesnitmetoder (26) eller en metode med tilsvarende følsomhed. Kroppen af disse fostre og de resterende intakte fostre behandles og undersøges for skeletforandringer med anvendelse af de samme metoder som beskrevet for gnavere.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data rapporteres for hver enkelt moderdyr og dets afkom og sammenfattes i tabelform med angivelse, for hver forsøgsgruppe, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle toksiske virkninger, arten af de fund, der er gjort på embryo/føtus, samt alle relevante data vedrørende afkommet.

Talresultaterne evalueres med en passende statistisk metode, hvor kuldet benyttes som enhed for dataanalysen, Der anvendes en almindelig anerkendt statistisk metode; valg af statistiske metoder skal indgå som en del af undersøgelsens design og skal begrundes. Data fra dyr, som ikke overlever indtil den planlagte aflivning, skal ligeledes rapporteres. Disse data kan, når det er relevant, indgå i gruppegennemsnittet. Relevansen af data for sådanne dyr og dermed om de skal indgå i et gruppegennemsnit eller ikke, skal begrundes og vurderes på individuel basis.

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Fundene i den prænatale udviklingstoksikologiske undersøgelse skal vurderes med hensyn til de iagttagne effekter. I vurderingen skal indgå følgende oplysninger:

— maternelle og embryonale/føtale testresultater, herunder vurdering af sammenhæng, eller mangel herpå, mellem dyrenes udsættelse for teststoffet og forekomst og sværhedsgrad af alle fund

— de anvendte kriterier for inddeling af føtale eksterne, bløddels- og skeletforandringer, såfremt inddeling er foretaget

▼B

— når det er hensigtsmæssigt, historiske kontroldata, som kan være nyttige ved tolkning af undersøgelsesresultaterne

— de tal, der ligger til grund for beregning af alle procenttal og indekser

— når det er hensigtsmæssigt, fyldestgørende statistisk analyse af undersøgelsesresultaterne, med tilstrækkelige oplysninger om analysemetoden til, at en uafhængig rapportør/statistiker kan revurdere og eftergøre analysen.

I enhver undersøgelse, som viser fravær af toksiske virkninger, skal nødvendigheden af supplerende undersøgelser til bestemmelse af teststoffets absorption og biotilgængelighed diskuteres.

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

En prænatal udviklingstoksicitetsundenøgelse giver oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et stof på moderdyrene og på den intrauterine udvikling af afkommet. Undersøgelsens resultater skal fortolkes i sammenhæng med fundene fra subkroniske, reproduktions-, toksikokinetiske og andre undersøgelser. Da der lægges vægt både på almen toksisk respons i form af maternel toksicitet og på udviklingstoksikologiske endpoints, vil undersøgelsens resultater i nogen grad gøre det muligt at skelne mellem de udviklingsmæssige effekter, som ikke er ledsaget af en almen toksisk virkning, og dem, som kun påføres på niveauer, som også er toksiske for moderdyret (27).

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende specifikke oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikation, herunder CAS-nummer, hvis dette kendes/findes

— renhed.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art og stamme

— antal dyr og deres alder

— oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

For forsøgsbetingelserne:

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om vedrørende formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

▼B

— oplysninger om administration af teststoffet

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— miljøbetingelser

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater:

Data vedrørende materiel toksisk respons for hver dosisgruppe, inklusive, men ikke begrænset til:

— antal dyr som indgår ved forsøgets start, antal overlevende dyr, antal drægtige, antal aborterende, antal dyr, som føder for tidligt

— dato for dødens indtræden under forsøget eller hvorvidt dyrene overlevede til slutningen

— data fra dyr, som ikke overlever indtil den planlagte aflivning, skal rapporteres, men skal ikke indgå i den statistiske gruppesammenligning

— dag for iagttagelse af hvert abnormt klinisk symptom og dets efterfølgende forløb

— kropsvægt. kropsvægtændring og vægten af den gravide uterus, herunder kropsvægtændring korrigeret for vægten af den gravide uterus (ikke obligatorisk)

— fødeindtagelse og (hvis den måles) vandindtagelse

— obduktionsfund, herunder vægt af uterus

— NOAEL-niveau for maternel og udviklingsmæssig effekt skal rapporteres.

Udviklingsmæssige endpoints for kuld med implantater, herunder:

— antal corpora lutea

— antal implantationer, antal og procentdel levende og døde fostre og resorptioner

— antal og procentdel præ- og postimplantationstab.

Udviklingsmæssige endpoints for kuld med levende fostre, herunder:

— antal og procentdel levende afkom

— kønsfordeling

— føtal kropsvægt, helst for hvert køn og for begge køn samlet

— udvendige, bløddels- og skeletmisdannelser og andre relevante forandringer

— eventuelle inddelingskriterier

▼B

— samlet antal og procentdel fostre og kuld med ydre, bløddels- eller skeletforandringer, samt type og incidens af enkeltabnormiteter og andre relevante forandringer.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner.

4. **HENVISNINGER**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Inf luence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Analysis 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicologv 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Speciflc Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Färbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimenielle Pathologie 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Ditferential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Cengenital Anomalies 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32; :381-391.

(9) Kimmel. C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; :398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8: 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46: 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Slam Technology 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, II.

(22) Wilson. J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity, Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, F.B. and CG. Bennett (1977) A Dissseting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, II, pp, 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment, Federal Register 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼**M4**

B.32. **KARCINOGENICITETSFORSØG**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 451 (2009). Den oprindelige TG 451 vedrørende karcinogenicitetsforsøg blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.32 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (2) (3) (4) (5) (6). Denne testmetode B.32 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode B.32 er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. De fleste karcinogenicitetsforsøg gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere, med de nødvendige ændringer. Yderligere vejledning findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

3. De tre primære administrationsveje i karcinogenicitetsforsøg er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i karcinogenicitetsforsøg. Karcinogenicitetsforsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af dermal applikation (7) og inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Karcinogenicitetsforsøget skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan vare de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper

— identifikation af målorganer for karcinogenicitet

— identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer

— karakterisering af forholdet mellem dosis-respons og tumor

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for karcinogenicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliet er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).

8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Vurderingen af karcinogenicitet bør udføres, når indledende informationer om toksicitet er

▼M4

indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering-/fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsesvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).

10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.

11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 12).

12. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (denne testmetode B.32). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.

▼M4

13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Testkemikaliet administreres normalt oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr i størstedelen af deres levetid. Test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Dyrene observeres nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Karcinogenicitetsforsøget bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelsesfrekvens, til det langvarige forsøg. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Opbevaring og fodring

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente

▼M4

organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af det anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hver dosisgruppe og samtidig kontrolgruppe skal derfor bestå af mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimater forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønnedet karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

Reserve til aflivninger under forsøget og satellitgrupper (sentineldyr)

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved 12 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Hvis aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som planlægges aflivet under forsøget, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Nærmere detaljer findes i Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

Dosisgrupper og dosering

21. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

22. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 23, vælges normalt det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en *negativ virkning,* som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.

23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliets virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.

24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

25. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

▼M4

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.

26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

27. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

28. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

29. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

30. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (7 dage om ugen) normalt i en periode på 24 måneder (se også afsnit 32). Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 24 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 24 måneder. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).

31. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.

Forsøgets varighed

32. Varigheden af forsøget er normalt 24 måneder for gnavere, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

— Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosisgrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.

— Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.

— Overlevelse vurderes separat for hvert køn.

— Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

▼M4

OBSERVATIONER

33. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans, idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

34. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser

35. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis det vurderes at være relevant, kan blodprøver udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser udtagning og urinanalyse som en del af aflivningen under forsøget (afsnit 20) og ved forsøgsafslutning på mindst 10 dyr pr. køn pr. gruppe. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse og opbevares under hensigtsmæssige forhold. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i forbindelse med vurderingen af karcinogent/onkogent potentiale (32).

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

36. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.

▼**M4**

37. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 33) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Luftrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculae seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserveres, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 og B.29 i dette bilag. For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

▼M4

Histopatologi

38. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (33). Følgende væv skal som minimum undersøges:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer

— når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

DATA OG RAPPORTERING

Data

39. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

40. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.

41. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

Testrapport

42. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

▼M4

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform)

Generelt

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, evt. beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand (hvis relevant)

— toksikokinetiske data (hvis de forefindes)

— oftalmoskopi (hvis tilgængelig)

— hæmatologi (hvis tilgængelig)

— klinisk kemi (hvis tilgængelig).

▼**M4**

Kliniske fund

— tegn på toksicitet

— incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

Obduktionsdata

— kropsvægt ved forsøgets slutning

— organvægt og deres forhold, hvis relevant

— obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

Histopatologi

— ikkeneoplastiske histopatologiske fund

— neoplastiske histopatologiske fund

— korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund

— detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader

— rapport om peer review af objektglas.

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

— diskussion af tilgange til modellering

— dosis-responsforhold

— historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

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

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

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

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

▼M4

(6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

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

(9) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakut toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg

(10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg

(11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M4

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

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

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

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

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

(27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

B.33. KOMBINERET FORSØG VEDRØRENDE KARCINOGENICITET/ KRONISK TOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 453 (2009). Den oprindelige TG 453 blev vedtaget i 1981. Denne opdaterede testmetode B.33 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (1) (2) (3) (4) (5). Denne testmetode B.33 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (7).

3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet/ karcinogenicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet. Langvarige forsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (7) (8) og dermal applikation (7). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan vare de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper

— identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer

— identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet

— identifikation af målorganer for kronisk toksicitet og karcinogenicitet

— karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis

— forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet og kroniske toksicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for dets toksikologiske egenskaber, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliet er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).

8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber,

▼M4

evt. oplysninger om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet/karcinogenicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering-/fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsesvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).

10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis.«

11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant i forbindelse med dette kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet.

12. Det bør overvejes at udføre dette kombinerede forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger og reducerer i et vist omfang det nødvendige antal forsøgsdyr i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-26) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet, og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser. Yderligere vejledning om designet af det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet for at opnå maksimal effekt af forsøget med hensyn til muligheder for at reducere det anvendte antal forsøgsdyr og strømline de forskellige testprocedurer findes i Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Forsøgsdesignet omfatter to parallelle faser, en kronisk fase og en karcinogenicitetsfase (se henholdsvis afsnit 34 og 35 for oplysninger om varighed). Testkemikaliet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. I forbindelse med den kroniske fase administreres testkemikaliet dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 34). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 20). I forbindelse med karcinogenicitetsfasen administreres testkemikaliet dagligt til flere grupper af forsøgsdyr i størstedelen af dyrenes levetid. I begge faser observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet/karcinogenicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene vedrørende toksicitet af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det dog overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelsesfrekvens, til det langvarige forsøg. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

▼M4

Opbevaring og fodringsbetingelser

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets karcinogenicitetsfase indeholde mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimater forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønne det karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets kronisk toksicitetsfase indeholde mindst 10 dyr af hvert køn. Det bemærkes, at dette antal er lavere end i forsøget vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag). Fortolkningen af data fra det reducerede antal dyr pr. gruppe i den kronisk toksicitetsfase af

▼M4

dette kombinerede forsøg støttes dog af data fra det større antal dyr i forsøgets karcinogenicitetsfase. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe i den kroniske toksicitetsfase til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgruppe og sentineldyr

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved seks måneder for den kroniske toksicitetsfase, for at fremskaffe oplysninger om progression af ikke-neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. De dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer data om aflivning under forsøget til forsøgets karcinogenicitetsfase, hvilket sikrer en generel reduktion i det anvendte antal dyr. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk fem dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Yderligere vejledning om forsøgsdesignet med henblik på at medtage dyr til aflivning under forsøget samt satellit- og sentineldyr, samtidig med at det samlede antal dyr i forsøget minimeres, findes i Guidance Document No. 116 (7).

21. Hvis satellitdyr og/eller aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som medtages til dette formål, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Dyr, der planlægges aflivet under forsøget, og satellitdyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

Dosisgrupper og dosering

22. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe for både den kroniske toksicitetsfase og karcinogenicitetsfasen. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

▼M4

23. For forsøgets kroniske toksicitetsfase kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt, hvis det kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, næppe vil fremkalde negative virkninger. Dette bør baseres på informationer fra forforsøg og det forhold, at toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

24. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Normalt vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.

25. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliets virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 27). Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes. Når et kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet gennemføres, er det primære mål at fremskaffe oplysninger til vurdering af karcinogenicitetsrisici, og oplysninger om kronisk toksicitet er normalt det sekundært mål. Dette skal erindres, når dosisniveauer og dosisintervaller vælges til forsøget.

26. Det valgte dosisinterval afhænger af forsøgsformålene og testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

27. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-linearitеter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

▼M4

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker, navnlig med hensyn til valget af mellemhøje og lave doser.

28. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt doseringsgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

29. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

30. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

31. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

32. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen) (se også afsnit 33 og 34). Andre doseringsregimer, f.eks. fem dage om ugen, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).

33. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen, bør undgås.

Forsøgets varighed

34. Doseringsperioden og varigheden af dette forsøgs kroniske fase er normalt 12 måneder, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. seks eller ni måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Alle dosisgrupper, der er tildelt til denne fase, afsluttes på det tidspunkt, der er fastsat til evaluering af kronisk toksicitet og ikke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering.

35. Varigheden af forsøgets karcinogenicitetsfase er normalt 24 måneder for gnavere, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

— Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosisgrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.

— Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.

— Overlevelse vurderes separat for hvert køn.

— Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

OBSERVATIONER (DEN KRONISKE TOKSICITETSFASE)

36. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.

37. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (32).

38. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliet. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.

39. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (32) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (33), (34), (35), gribestyrke (36) og motorisk aktivitet (37) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

▼M4

40. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

41. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver

42. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 19). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.

43. Følgende parametre bør undersøges (38): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikaliet har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocyttællinger og knoglemarvcytologi også være indiceret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.

44. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske

▼M4

målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør faste inden blodprøvetagning ([1]). Følgende parametre bør undersøges (38): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, kalcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdesyrer) (39) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5′-nucleotidase, total bilirubin og totale galdesyrer) (39). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.

45. Urinanalyser udføres på alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved tre måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgik i en ekspertanbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (38): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

46. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (38). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 58) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

47. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal normalt have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 21). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentineldyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikkefaste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Alle dyr bør vurderes i samme fysiologiske tilstand, og detaljerede eller neurologiske vurderinger bør derfor efter planen gennemføres en anden dag end udtagningen af de klinisk-biokemiske prøver.

▼**M4**

48. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 47. Binyrer, hjerne, bitestikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejet efter fiksering, med paratyreoideae) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

49. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Luftrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculae seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat
Harderian-kirtel			

▼M4

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

50. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter

— målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFASEN)

51. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans. Ved sondeforsøg kontrolleres dyrene i perioden umiddelbart inden doseringen. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.

52. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

▼M4

Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser

53. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Data om dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer oplysninger om disse parametre. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis blodprøver udtages, tages de ved slutningen af forsøgsperioden lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i karcinogenicitetsfasen i forbindelse med vurderingen af karcinogent/onkogent potentiale (38).

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

54. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.

55. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Luftrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculae seminales	Urinblære

▼**M4**

Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

56. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). Følgende væv skal som minimum undersøges:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer

— når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OG KRONISK TOKSICITET)

Data

57. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

58. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.

59. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

60. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

▼**M4**

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):

Generelt

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt

— toksikokinetiske data, hvis de forefindes.

— oftalmoskopi (hvis tilgængelig)

— hæmatologi (hvis tilgængelig)

— klinisk kemi (hvis tilgængelig).

Kliniske fund

— tegn på toksicitet

— incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

Obduktionsdata

— kropsvægt ved forsøgets slutning

— organvægt og deres forhold, hvis relevant

— obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

Histopatologi

— ikkeneoplastiske histopatologiske fund

— neoplastiske histopatologiske fund

▼M4

— korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund

— detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader

— rapport om peer review af objektglas.

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

— diskussion af tilgange til modellering

— dosis-responsforhold

— historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

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

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

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

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

(6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

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

(9) Kapitel B.8 i dette bilag. Subkronisk toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg

(10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg

(11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

▼M4

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

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

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

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

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

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

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

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

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

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

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

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

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

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

▼M4

(27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

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

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(39) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

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

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.34. **REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. Handyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet måtte have på spermatogenesen.

Hundyr i F_0-generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder for at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Derefter parres dyrene. Begge køn doseres med teststof i parringsperioden, og derefter doseres kun hundyrene i drægtighedsperioden og laktationsperioden. Hvis dosering med teststof foregår ved inhalation, kræves ændringer af metoden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i grupper. Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administration kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres med teststoffet syv dage om ugen.

▼B

Forsøgsdyr

Valg af dyreart

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Der benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænnet, før dosering påbegyndes.

Antal og køn

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunktet.

Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i F_0-generationen samt dieadfærd, vækst og udvikling i F_1-generationen fra undfangelse til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hundyr i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre (F_0)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de mindste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældregenerationen eller afkommet, Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hundyr kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledende undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelig virkning på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

▼B

Fremgangsmåde

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre (F_0)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsættes doseringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Handyrene skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes. Dosering af forældregenerationens hundyr indledes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af F_0-hundyrene fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til F_1-generationen er vænnet fra. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et handyr og et hundyr) eller 1:2 (et handyr og to hundyr) i undersøgelser af reproduktionstoksicitet.

Anvendes 1:1 parring, anbringes et hundyr med ethandyr, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået, Hver morgen undersøges hundyrene for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges under hensyntagen til spermatogenesen som den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed.

Dette kan gøres ved, at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov til at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvænning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering, foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen, standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr,

Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger.

▼B

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen (og vandindtagelsen, hvis teststoffet administreres heri) registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Han- og hundyr af F_0-generationen vejes den dag, doseringen indledes og derefter en gang om ugen. Disse observationer bar rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungernes antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomst af makroskopisk synlige abnormiteter.

Døde unger og unger, som aflives på dag 4, skal opbevares og undersøges for mulige defekter. Levende unger tælles, og kuldet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7, og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt.

Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hundyrene eller afkommet skal registreres.

Patologisk undersøgelse

Makroskopisk undersøgelse

F_o-generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges makroskopisk med henblik på konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktionssystemet. Døde eller døende unger undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i F_0-generationen præpareres med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges organerne fra dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis, og i kontrolgruppen samt de dyr, som er døde under forsøget, mikroskopisk, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i F_0-generationen. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

▼B

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal frugtbare handyr, antal drægtige hundyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring.

Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— anvendt dyreart/stamme

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning eller planlagt aflivningstidspunkt

— tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungernes gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning

— toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder- og legemsvægt for Fo-generationen

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.35. **REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 416 (2001).

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode til reproduktionsundersøgelse i to generationer er at skaffe generelle oplysninger om et teststofs effekter på forplantningssystemets integritet og funktion hos han- og hundyr, herunder gonadefunktion, brunstcyklus, parringsadfærd, konception, drægtighed, fødsel, laktation og fravænning samt afkommets vækst og udvikling. Undersøgelsen kan desuden give oplysninger om teststoffets effekter på den neonatale morbiditet og mortalitet samt foreløbige data om præ- og postnatal udviklingstoksicitet, foruden at tjene som vejledning for efterfølgende forsøg. Ud over at undersøge F_1-generationens vækst og udvikling har metoden til formål at vurdere forplantningssystemets integritet og funktion hos han- og hundyr samt vækst og udvikling i F_2-generationen. For at skaffe supplerende viden om udviklingstoksicitet og funktionelle mangler kan man enten supplere denne protokol med forsøgsafsnit, som alt efter behov er baseret på metoder til undersøgelse af udviklingstoksicitet og/eller udviklingsneurotoksicitet, eller gøre disse endpoints til genstand for særskilte forsøg med egnede forsøgsmetoder.

1.2. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Teststoffet administreres i graduerede doseringer til flere grupper hanner og hunner. Hannerne i P-generationen (F_0-generationen) modtager stoffet i vækstperioden og i mindst én hel spermatogenesecyklus (ca. 56 døgn hos mus og 70 døgn hos rotter) for at fremkalde eventuelle negative virkninger på spermatogenesen. Effekterne på sperma bestemmes ved en række spermaparametre (f.eks. spermiemorfologi og -motilitet) og ved fremstilling af vævspræparater til detaljeret histopatologisk undersøgelse. Hvis der foreligger data vedrørende spermatogenesen fra et tidligere forsøg med gentagen dosering af tilstrækkelig varighed, f.eks. et 90-dages forsøg, behøver hannerne i P-generationen ikke indgå i vurderingen. Det anbefales dog at opbevare prøver eller digitale optagelser af spermier fra P-generationen med henblik på senere vurdering. Hunner i P-generationen doseres i vækstperioden og gennem flere hele brunstcyklusser for at bestemme eventuelle negative virkninger af teststoffet på den normale brunstcyklus, Teststoffet administreres til forældredyrene (P) i parringsperioden, gennem den resulterende drægtighedsperiode og gennem fravænningsperioden af afkommet F_1, Fra fravænningstidspunktet administreres stoffet til F_1-afkommet under dettes opvækst og ind i voksenalderen, parringsperioden og frembringelse af en F_2-generation, indtil F_2-generationen er fravænnet.

Alle dyr iagttages klinisk og undersøges patologisk for tegn på toksicitet med særlig vægt på integritet og funktion af forplantningssystemet hos han- og hundyr samt afkommets vækst og udvikling.

▼B

1.3 BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.3.1. **Valg af dyreart**

Rotten er den foretrukne art til forsøget. Anvendes andre arter, bør dette begrundes, og passende modifikationer vil være nødvendige. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen mellem de anvendte dyr være mindst mulig og for hvert køn ikke over 20 % af gennemsnitsvægten.

1.3.2. **Miljøbetingelser og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke overstige 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand. Valget af foder kan afhænge af nødvendigheden af at sikre passende iblanding af teststoffet, når denne administrationsmåde anvendes.

Dyrene kan enten anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Parring bør finde sted i bure egnede til formålet. Efter tegn på kopulation anbringes de parrede hunner enkeltvis i fødebure eller yngelbure. De parrede rotter kan også holdes i små grupper og adskilles en eller to dage før fødslen. Parrede dyr skal forsynes med egnet og nærmere bestemt redemateriale, når fødselstidspunktet nærmer sig.

1.3.3. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes raske unge dyr. som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst fem døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg, Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og/eller alder. Eventuelle søskenderelationer mellem dyrene skal være kendt, så parring af søskende undgås. Dyrene fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper (stratificering efter kropsvægt anbefales). Burene skal arrangeres således, at eventuelle virkninger af burenes placering er mindst mulig. Hvert dyr tilordnes et unikt identifikationsnummer, For P-generationen skal dette ske inden doseringen begynder, For F_1-generationen skal dette ske ved fravænningen for dyr, som udvælges til parring. For alle udvalgte F_1-dyr registreres, hvilket kuld de er fra. Når det overvejes at benytte individuel vejning af unger eller foretage funktionstest, anbefales, at ungerne identificeres individuelt snarest efter fødslen.

Forældredyr (P) skal være 5 til 9 uger gamle, når doseringen påbegyndes. Dyrene i alle forsøgsgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder.

▼B

1.4. FREMGANGSMÅDE

1.4.1. **Dyrenes antal og køn**

I hver behandlings- og kontrolgruppe skal der være tilstrækkeligt med dyr til, at gruppen ved eller nær fødselstidspunktet består af helst mindst 20 drægtige hunner, For stoffer, som er årsag til uønskede behandlingsrelaterede virkninger (f.eks. sterilitet, stærk toksicitet i den høje dosering), kan dette eventuelt være umuligt. Formålet er at producere tilstrækkeligt med afkom til at sikre en meningsfuld vurdering af teststoffets potentiale for påvirkning af fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd og diegivning, F_1-afkommets vækst og udvikling fra undfangelsen til fuld kønsmodning, og udviklingen af dettes afkom (F_2), frem til dyrene er vænnet fra. Hvis det ikke er lykkedes at frembringe det ønskede antal drægtige dyr (dvs. 20), er undersøgelsen ikke dermed nødvendigvis ugyldig, og der bør finde en konkret vurdering sted i det enkelte tilfælde.

1.4.2. **Tilberedning af doser**

Det anbefales, at teststoffet administreres oralt (i foderet, i drikkevandet eller med sonde), medmindre en anden administrationsvej (f.eks. dermal applikation eller inhalation) anses for mere velegnet.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand må vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Teststoffets stabilitet i vehiklet skal bestemmes.

1.4.3. **Dosering**

Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, skal den højeste dosering vælges således, at den giver toksisk effekt, men ikke død eller alvorlige lidelser. I tilfælde af uventet dødelighed er forsøg med en dødelighed på under ca. 10 % i forældregenerationen (P) normalt stadig acceptable. Der vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons samt det niveau, hvor ingen skadelig effekt iagttages (NOAEL). Ved fastlæggelse af en sådan aftagende række dosisniveauer vil det optimale interval ofte svare til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må det foretrækkes at tilføje en fjerde behandlingsgruppe frem for at operere med meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. I undersøgelser med indgift i foderet bør dosisintervallet ikke være større end svarende til en faktor 3. Doseringen vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitetsdata, især resultaterne af forsøg med gentagen dosering. Eventuelle foreliggende oplysninger om metabolisme og kinetik af teststoffet eller beslægtede stoffer skal ligeledes tages i betragtning. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre det hensigtsmæssige i den valgte dosering.

▼B

Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af teststoffet. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgruppen (-grupperne) håndteres på samme måde som behandlingsgruppen. Anvendes vehikel, skal dyrene i kontrolgruppen modtage vehiklet i det største anvendte volumen. Hvis et teststof administreret i foderet medfører reduceret fødeindtagelse eller -udnyttelse, kan parvis fodring sammen med kontrolgruppen være nødvendig. I stedet for parvis fodring sammen med kontrolgruppen kan anvendes data fra kontrollerede undersøgelser, som er udformet til vurdering af virkningerne af nedsat fødeindtagelse på reproduktionsparametrene.

For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende egenskaber tages i betragtning: Dets effekt på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets eventuelle indvirkning på teststoffets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand.

1.4.4. **Grænsetest**

Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/døgn eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet med de til dette forsøg beskrevne metoder hverken frembringer observerbar toksisk virkning i forældredyrene eller deres afkom, og såfremt foreliggende data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser ikke giver anledning til at forvente nogen virkning, er et komplet forsøg med flere dosisniveauer ikke nødvendigvis påkrævet, Grænsetesten skal være gældende, medmindre den påregnede udsættelse af mennesker tilsiger, at der anvendes et højere oralt dosisniveau. For andre administrationsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. opløseligheden, ofte være bestemmende for og begrænsende for det maksimale opnåelige ekspositionsniveau.

1.4.5. **Administration af doser**

Dyrene modtager teststoffet syv dage om ugen. Oral administration (foder, drikkevand eller sonde) er at foretrække. Anvendes anden administrationsvej, bør valget begrundes, og passende modifikationer kan være nødvendige. Alle dyr skal modtage stoffet på samme måde i den pågældende forsøgsperiode. Administreres teststoffet med sonde, skal en gastrisk sonde anvendes. Der må ikke på én gang gives et væskevolumen over 1 ml/l00 g kropsvægt (for majsolie ikke over 0,4 ml/100 g kropsvægt), bortset fra vandige opløsninger, som kan gives i mængder på 2 ml/100 g kropsvægt, Hvis der ikke er tale om lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis er værre ved højere koncentration, skal variabiliteten af testvolumenet minimeres gennem justering af koncentrationen, således at der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. I forsøg med indgift gennem sonde vil ungerne normalt kun få teststoffet indirekte gennem mælken, indtil den direkte dosering begynder ved fravænning. I forsøg med indgift gennem foder eller drikkevand vil ungerne desuden modtage teststoffet direkte, når de begynder selv at æde i den sidste del af laktationsperioden.

▼B

For stoffer administreret i foderet eller drikkevandet er det vigtigt at sikre, at det pågældende teststof i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance, Ved indgift af teststoffet i foderet kan stoffet enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; det skal angives, hvilken mulighed der er valgt. Ved indgift med sonde skal dosis gives pa tilsvarende tidspunkt hver dag og skal justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Ved justering af doseringen via sonde på grundlag af vægten skal kendskabet til fordelingsforholdene i placenta tages betragtning,

1.4.6. **Forsøgsplaner**

Den daglige indgift til hanner og hunner i forældregenerationen (P) begynder, når dyrene er 5 til 9 uger gamle. Den daglige dosering af hanner og hunner i F_1-generationen begynder ved fravænningen; man bør have for øje. at ved administration af teststoffet i foder eller drikkevand kan ungerne i F_1-gruppen blive direkte eksponeret for teststoffet allerede i laktationsperioden. For begge køn (P og F_1) skal doseringen fortsætte i mindst 10 uger før parringsperioden. Doseringen fortsætter hos begge køn i den to uger lange parringsperiode. Når der ikke længere er brug for handyrene til vurdering af reproduktionstoksiske virkninger, aflives de af humane grunde og undersøges. For hunner i forældregenerationen (P) fortsætter doseringen gennem hele drægtighedspeiioden og indtil fravænning af afkommet i F_1-generationen. Ændringer i doseringsplanen må overvejes ud fra de foreliggende oplysninger om teststoffet, herunder foreliggende toksicitetsdata, induktion af metabolisering samt bioakkumulering. Doseringen til det enkelte dyr bør normalt baseres på den seneste individuelle bestemmelse af dyrets vægt. I drægtighedsperiodens sidste trimester må dog udvises forsigtighed med justering af doseringen.

Behandlingen af hanner og hunner i P- og F_1-generationen skal fortsætte til forsøgets afslutning, Af humane grunde aflives alle voksne hanner og hunner i P- og F_1-generationen, når der ikke længere er brug for dem til vurdering af reproduktionstoksiske virkninger. Af humane grunde aflives de dyr i F_1 generationen, som ikke udvælges til parring, og alle dyr i F_2-generationen.

1.4.7. **Parringsmetode**

1.4.7.1. *Parring af forældregenerationen (P)*

Til hver parring anbringes hver hun sammen med én han på samme dosisniveau (1:1 parring), indtil kopulation finder sted eller der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver dag for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 er den dag, hvor der findes en vaginalprop eller sperma. Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes. De parrede dyr skal være tydeligt identificeret i data. Parring af søskende skal undgås.

▼B

1.4.7.2. *Parring af F_1*

Til parring af F_1-afkommet vælges mindst én han og én hun fra hvert kuld ved afvænningen til parring med andre unger på samme dosisniveau, men fra et andet kuld, med henblik på frembringelse af F_2-generationen. Valg af unger fra hvert kuld skal ske tilfældigt, når der ikke iagttages væsentlige forskelle i kropsvægt eller udseende mellem magerne fra kuldene. Iagttages sådanne forskelle, vælges den bedste repræsentant for hvert kuld. Det mest pragmatiske er at dette sker på vægtbasis, men det kan være mere hensigtsmæssigt at lade det ske på basis af udseendet. F_1-afkommet må ikke parres, før de er fuldt kønsmodne.

Par uden afkom vurderes med henblik på bestemmelse af den tilsyneladende årsag til steriliteten. Dette kan bestå i at give mulighed for en ekstra parring med afprøvede fædre eller mødre, makroskopisk undersøgelse af kønsorganerne og undersøgelse af brustcyklus eller spermatogenese.

1.4.7.3. *Anden parring*

I visse tilfælde, således ved behandlingsrelaterede ændringer i kuldstørrelse eller tvivlsom effekt af første parring, anbefales det, at de voksne dyr i P- eller F_1-generationen parres igen, så de får endnu et kuld unger. Det anbefales, at de hanner eller hunner, som ikke har frembragt afkom, parres igen med påvist yngledygtige dyr af det modsatte køn. Hvis det skønnes nødvendigt at producere et ekstra kuld i nogen af generationerne, skal dyrene parres igen ca. en uge efter fravænning af sidste kuld.

1.4.7.4. *Kuldstørrelse*

Dyrene skal yngle på normal måde og pleje afkommet indtil fravænning. Standardisering af kuldstørrelserne er frivillig. Anvendes standardisering, skal metoden beskrives i detaljer.

1.5. OBSERVATIONER

1.5.1. **Klinisk observation**

Dyrene observeres dagligt klinisk, og ved sondeindgift foretages denne observation under hensyntagen til tidspunktet for den forventede maksimale virkning efter administrationen. Adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller langstrakt fødsel og alle tegn på toksicitet registreres. En yderligere, mere detaljeret undersøgelse af hvert dyr foretages mindst en gang ugentligt, hvilket passende kan ske i forbindelse med vejning af dyret. Alle dyr iagttages to gange dagligt for morbiditet ug mortalitet, i weekenden én gang dagligt når det er hensigtsmæssigt.

▼B

1.5.2. **Forældredyrenes kropsvægt og føde- og vandindtagelse**

Forældredyrene (P og F_1) vejes den første dag de modtager stoffet og derefter mindst en gang om ugen. Hunnerne i forældregenerationerne (P og F_1) vejes som minimum på dag 0, 7, 14, og 20 eller 21 i drægtighedsperioden, i laktationsperioden på de dage, hvor kuldene vejes, samt på aflivningsdagen. Disse iagttagelser rapporteres individuelt for hvert voksent dyr. I tiden før parring og i drægtighedsperioden skal fødeindtagelsen måles mindst en gang om ugen. Vandindtagelsen skal måles mindst en gang om ugen, hvis teststoffet gives i vandet.

1.5.3. **Brunstcyklus**

Hos hunnerne i P- og F_1-generationen vurderes brunstcyklussens længde og normale forløb med vaginalt smear før parring samt ikke obligatorisk i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring, Udtagning af celleprøve fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå forstyrrelse af slimhinden med efterfølgende induktion af pseudodrægtighed (1).

1.5.4. **Spermaparametre**

For alle hanner i P- og F_1 generationen registreres vægten af testes og epididymides ved forsøgets slutning, og det ene af hvert organ udtages til histopatologisk undersøgelse (se punkt 1.5.7, 1.5.8.1). Fra en delmængde bestående af mindst 10 hanner af hver gruppe hanner i P- og F_1-generationen anvendes de øvrige testes og epididymides til tælling af henholdsvis homogeniseringsresistente spermatider og spermiebeholdning i cauda epididymidis. For samme delmængde af hanner opsamles sperma fra cauda epididymidis eller vas deferens til undersøgelse af spermiemotilitet og spermiemorfologi. Hvis der iagttages behandlingsrelaterede virkninger eller der i andre undersøgelser er fundet tegn på en mulig påvirkning af spermatogenesen, skal spermaundersøgelse finde sted hos alle hanner i hver dosisgruppe; ellers kan optællingen indskrænkes til kontrolgruppen og hannerne i højdosisgrupperne i P og F_1.

Det samlede antal homogeniseringsresistente testikulære spermatider og spermier i cauda epididymidis opgøres (2)(3). Spermiebeholdningen i cauda kan beregnes af spermiekoncentration og -volumen i den suspension, der benyttes til den kvalitative vurdering og antallet af spermier, som opsamles ved findeling og/eller homogenisering af det øvrige caudavæv. Optællingen på den valgte delmængde af hanner af alle dosisgrupper foretages straks efter aflivning af dyrene, medmindre prøverne fryses og analyseres senere, I disse tilfælde kan kontroldyrene og højdosisgruppen analyseres først. Hvis der ikke optræder behandlingsrelaterede virkninger (på f.eks, spermietal, -motilitet og -morfologi), behøver de andre dosisgrupper ikke analyseres. Findes der behandlingsrelaterede virkninger i højdosisgruppen, skal grupperne på lavere dosis også analyseres.

▼B

Motiliteten af spermier i epididymis (eller ductus deferens) bedømmes eller optages på videobånd straks efter aflivning. Udtagning af af spermier skal ske på en måde, så skaden er mindst muligt, og spermierne fortyndes med henblik på motilitetsanalyse med acceptable metoder (4). Procentdelen af fremadbevægelige (progressivt motile) spermier bestemmes enten subjektivt eller objektivt. Foretages der computerassisteret motilitetsanalyse (5)(6)(7)(8)(9)(10) er beregningen af progressiv motilitet baseret på brugerdefinerede tærskelværdier for gennemsnitsvejlængde, hastighed og retlinjethed (lineært indeks). Hvis der optages videobånd af prøverne (11) eller billederne på anden måde registreres på obduktionstidspunktet, kan den efterfølgende analyse af handyr i P- og F_1-generationen indskrænkes til kontrol- og højdosisgrupppen, medmindre der konstateres behandlingsrelaterede virkninger, i hvilket tilfælde også grupperne på de lavere doseringer skal bedømmes. I mangel af videooptagelse eller digitalt billede skal alle prøver fra alle behandlingsgrupper analyseres ved obduktionen.

Der foretages en morfologisk bedømmelse af en spermaprøve fra epididymis (eller vas deferens), Spermier (mindst 200 i hver prøve) undersøges som fikserede, våde præparater (12) og klassificeres som enten normale eller anormale. Som eksempel på morfologiske spermieabnormiteter kan nævnes sammensmeltning, isoleret hoved og misdannet hoved og/eller hale. Optællingen finder sted på den udvalgte delmængde af hanner fra alle grupper enten straks efter aflivning af dyrene eller senere baseret på videobånd og digitale optagelser, Smears kan, når først de er fikseret, undersøges senere. I disse tilfælde kan kontroldyrene og højdosisgruppen analyseres først. Hvis der ikke optræder behandlingsrelaterede virkninger (f.eks. virkninger på spermiemorfologien), behøver de andre dosisgrupper ikke analyseres. Når der konstateres behandlingsrelaterede virkninger i højdosisgruppen, skal grupperne på lavere dosering også analyseres.

Hvis nogen af ovennævnte parametre for spermieevaluering allerede er undersøgt som led i en systemisk toksicitetsundersøgelse af mindst 90 dages varighed, behøver de ikke nødvendigvis gentages i to generationers forsøget. Det anbefales dog, at prøver eller digitale optagelser af spermier fra P-generationen opbevares for at give mulighed for senere vurdering, hvis dette viser sig nødvendigt.

1.5.5. **Afkom**

Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen (dag 0 i laktationsperioden) til bestemmelse af ungernes antal og køn. dødfødte, levendefødte og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter. Unger, som findes døde på dag 0 bør, hvis de ikke er opløst, helst undersøges for eventuelle defekter og dødsårsag og præserveres. Levende unger tælles og vejes enkeltvis ved fødslen (dag 0 i laktationsperioden) eller på dag 1, og derefter på de regelmæssige vejningsdage, dvs, på dag 4, 7, 14 og 21 i laktationsperioden. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter iagttaget hos moderdyr eller afkom skal registreres.

▼B

Afkommets fysiske udvikling skal registreres, hovedsagelig som stigning i kropsvægt, Andre fysiske parametre (f.eks åbning af ører og øjne, tandfrembrud, hårvækst) kan give supplerende oplysninger, men evalueringen deraf bør fortrinsvis finde sted sammen med data vedrørende kønsmodning (f.eks. alder og kropsvægt på tidspunktet for åbning af vagina eller for den balano-præputiale separation) (13). Det anbefales at udføre funktionelle undersøgelser (f.eks udvikling i motorisk aktivitet, sansefunktioner, reflekser) på F_1-generationen før og/eller efter afvænning, medmindre sådanne undersøgelser indgår i særskilte forsøg: Især gælder dette undersøgelser relateret til kønsmodningen. For de fravænnede unger i F_1-generationen, som er udvalgt til parring, bestemmes alderen på tidspunktet for åbning af vagina og separation af præputium. På ungerne i F_2-generationen måles den anogenitale afstand ved dag 0 efter fødslen, når dette tilsiges af forandringer i Figenerationens kønssammensætning eller tidspunktet for kønsmodning.

Funktionsundersøgelser kan udelades for grupper, som på anden måde viser tydelige tegn på negative påvirkninger (f.eks. væsentligt nedsat tilvækst osv.). Foretages der funktionsundersøgelser, skal disse ikke omfatte de unger, der er udvalgt til parring.

1.5.6 **Makroskopisk undersøgelse ved obduktion**

Ved forsøgets slutning eller ved indtræden afdød under undersøgelsen undersøges alle forældredyr (P og F_l), alle unger med ydre abnormiteter eller kliniske symptomer samt en (et) tilfældigt udvalgt unge/køn/kuld fra både F_l- og F_2-generationen makroskopisk for eventuelle strukturabnormiteter og patologiske forandringer. Særligt kønsorganerne skal undersøges. Unger, som aflives af humane grunde i moribund tilstand samt døde unger, når de ikke er opløst, undersøges for eventuelle defekter og/eller dødsårsag og præserveres.

På alle førstegangsfødende hunner undersøges uterus på en måde, som ikke vanskeliggør histopatologisk bedømmelse, for tilstedeværelse af og antal implantationssteder.

1.5.7. **Organvægt**

Ved forsøgets afslutning bestemmes kropsvægt og vægten af følgende organer på alle forældredyr i P-generationen og F_1-generationen (parrede organer vejes enkeltvis):

— uterus, ovarier

— testes, epididymides (total og cauda)

— prostata

— vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands) og disses væskeindhold samt prostata (som én samlet enhed)

— hjerne, lever, nyrer, milt, hypofyse, skjoldbruskkirtel og binyrer samt kendte målorganer.

Kropsvægten ved forsøgets slutning bestemmes for under i F_1- og F_2-generationen, som udvælges til obduktion, og følgende organer fra den (det) ene tilfældigt udvalgte unge/køn/kuld (se punkt 1.5.6) vejes: hjerne, milt og thymus.

▼B

Resultaterne af den makroskopiske obduktion og organvejningen sammenholdes, når det er praktisk muligt, med observationer fra andre forsøg med gentagen dosering.

1.5.8. **Histopatologi**

1.5.8.1. *Forældredyr*

Følgende organer og væv fra forældredyr (P og F_1) eller repræsentative prøver deraf fikseres og opbevares i et passende medium til histopatologisk undersøgelse:

— vagina, uterus med cervix og ovarier (præserveret i hensigtsmæssigt fiksativ)

— én testis (præserveret i Bouins fiksativ eller tilsvarende), én epididymis, vesiculae seminales, prostata og prostata anterior (coagulating gland)

— tidligere udpegede målorgan(er) fra alle de dyr i P- og F_1-generationen, som er udvalgt til parring.

Af ovennævnte præserverede organer og væv foretages fuldstændig histopatologisk undersøgelse for alle de dyr i højdosis- og kontrolgrupperne i P- og F_1-generationen, som er udvalgt til parring. Undersøgelse af ovarierne fra dyrene i P-generationen er ikke obligatorisk. De organer fra lav- og mellemdosisgrupperne, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, skal ligeledes undersøges som led i fastsættelsen af NOAEL. Derudover skal den histopatologiske undersøgelse omfatte kønsorganerne fra de dyr i lav- og mellemdosisgruppen, som mistænkes for nedsat fertilitet, fordi de f.eks. ikke har været i stand til at parre sig, undfange, besvangre eller føde rask afkom, eller hvis brunstcyklus, spermietal -motilitet eller -morfologi var påvirket. Alle makroskopiske forandringer som atrofi eller tumorer undersøges.

Detaljeret histopatologisk undersøgelse af testes (f.eks. med Bouins fiksativ, paraffinfiksering og tværsnit af 4-5µm's tykkelse) skal foretages til påvisning af behandlingsrelaterede effekter som manglende frigivelse af spermatider, manglende kimcellelag eller -typer, multinukleære kæmpeceller eller vandring af spermatogene celler ind i lumen (14). Undersøgelse af den intakte epididymis skal omfatte caput, corpus og cauda, hvilket kan ske ved vurdering af et længdesnit. Epididymis skal gennemgås med henblik på leukocytinfiltration, ændret forekomst af celletyper, afvigende celletyper, og fagocytose af spermier. Til undersøgelse af handyrenes kønsorganer kan anvendes PAS- og hæmatoxylinfarvning.

Ovariet i postlaktationsperioden skal indeholde primordial- og voksende follikler foruden de store corpora lutea fra laktationsperioden. Den histopatologiske undersøgelse skal kunne påvise en eventuel kvalitativ forringelse af bestanden af primordialfollikler. For hundyr i F_1-generationen foretages en kvantitativ vurdering af primordialfolliklerne; antal dyr, valg af ovariesnit og størrelsen af prøvesnit skal være statistisk tilpasset den anvendte vurderingsmetode. Undersøgelsen skal omfatte en optælling af primordialfollikler, hvilket kan kombineres med optælling af små voksende follikler, med henblik på sammenligning af ovarierne i behandlingsgmppe og kontrolgruppe (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Fravænnede unger*

Makroskopisk abnormt væv og målorganer fra alle unger med ydre abnormiteter eller kliniske symptomer samt fra den/det ene tilfældigt udvalgte unge/køn/kuld fra både F_1- og F_2-generationen, som ikke er udvalgt til parring, fikseres og opbevares i et passende medium til histopatologisk undersøgelse. Det præserverede væv skal gennemgå fuld histopatologisk karakterisering med særlig vægt på kønsorganerne.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data rapporteres for hver forsøgsgruppe og generation og sammenfattes i tabelform med angivelse, for hver forsøgsgruppe og hver generation, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal fertiele dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de fund, der er gjort på forældredyr og afkom, arten af de histopatologiske forandringer, og alle relevante data om kuldene.

Til bedømmelse af talmateriale anvendes en hensigtsmæssig, almindelig anerkendt statistisk metode; valg af statistiske metoder skal indgå som en del af undersøgelsens design og skal begrundes. Statistiske modeller for dosis-respons-sammenhæng kan være nyttige til dataanalyse. Rapporten skal indeholde tilstrækkelige oplysninger om analysemetoden til, at en uafhængig rapportør/statistiker kan revurdere og gentage analysen.

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Fundene i denne reproduktionsundersøgelse i to generationer vurderes med hensyn til de iagttagne effekter, herunder obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng, eller mangel herpå, mellem dyrenes udsættelse for teststoffet og tilstedeværelse eller fravær, incidens og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske forandringer, identificerede målorganer, påvirkning af fertiliteten, unormale kliniske fund, påvirkning af reproduktions- og ynglepræstationer, kropsvægtforandringer, indvirkning på mortaliteten og eventuelle toksiske effekter. Prøvestoffets fysisk-kemiske egenskaber og eventuelle foreliggende toksikokinetiske data skal indgå i vurderingen af forsøgets resultater.

En korrekt udført reproduktions-toksicitetsundersøgelse skal give et tilfredsstillende skøn over nulvirkningsniveauet og indsigt i negative virkninger på reproduktion, fødsel, laktation og postnatal udvikling, herunder vækst og kønsmodning.

▼B

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

En reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer giver oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et stof i alle faser af reproduktionscyklussen. Navnlig giver undersøgelsen oplysninger om reproduktionsparametre og om afkommets udvikling, vækst, kønsmodning og overlevelse. Undersøgelsens resultater skal fortolkes i sammenhæng med fundene i forsøgene vedrørende subkronisk toksicitet, prænatal udviklingstoksicitet, toksikokinetik og andre foreliggende undersøgelser. Undersøgelsens resultater kan anvendes til at vurdere behovet for yderligere undersøgelse af et kemisk stof. Undersøgelsens resultater kan i begrænset omfang overføres til mennesker. Resultaterne kan bedst anvendes til at give oplysninger om nulvirkningsniveau og tilladelig eksponering af mennesker (20)(21)(22)(23).

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— renhed.

For eventuel vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, redematerialer osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

For forsøgsbetingelserne:

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration

— tilberedningens stabilitet og homogenitet

— oplysninger om administration af teststoffet

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

▼B

For resultaterne:

— fødeindtagelse og vandforbrug, hvis disse foreligger, foderudnyttelse (kropsvægtforøgelse pr. gram indtaget foder), og forbrug af forsøgsmateriale for P- og F_1 dyrene, bortset fra perioden hvor dyrene har været sammen og for mindst den sidste tredjedel af laktationsperioden

— absorptionsdata (hvis de foreligger)

— kropsvægtdata for dyrene i P- og F_1-generationen udvalgt til parring

— vægtdata for kuld og unger

— kropsvægt ved aflivning og absolut og relativ organvægt for forældredyrene

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— tidspunktet for dødens indtræden under forsøget eller hvorvidt dyrene overlevede til forsøgets afslutning

— toksisk respons fordelt på køn og dosering, med angivelse af indekstal for parring, fertilitet, drægtighed, fødsel, levedygtighed og laktation; rapporten skal angive de tal, der er benyttet til beregning af sådanne indekser

— toksisk effekt eller andre effekter på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— antal hunner i P- og F_1-generationen med normal brunstcyklus, og cyklussens længde

— totalt antal spermier i cauda epididymis, procentdel progressivt motile spermier, procentdel morfologisk normale spermier, og procentdel spermier med hver af de fundne abnormiteter

— tid indtil parring, inkl. antal døgn indtil parring finder sted

— drægtighedsperiodens længde

— antal implantationer, corpora lutea, kuldstørrelse

— antal levendefødte og postimplantationstab

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter, antal små uudviklede unger skal angives, hvis de er optalt

— data vedrørende fysiske kendetegn hos unger, og andre data vedrørende den postnatale udvikling; Det skal begrundes, hvilke fysiske kendetegn der er evalueret

— i det omfang det er relevant, data vedrørende iagttagelser af funktioner hos unger og voksne

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

▼B

Diskussion af resultater.

Konklusioner, herunder NOAEL (højeste niveau uden tegn på skadelig effekt) for moderdyr og afkom.

4. **HENVISNINGER**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mummals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al, (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction und Fertility 54:103-107.

(4) Kimefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology 5:39 44.

(5) Seed. J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10(3):237-244.

(6) Chapin, R.E. et al. (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. Journal of Andrology 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologie Considerations. Reproductive Toxicology 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth. G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologie and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10:401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographie Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J.Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, I. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.). Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼**M4**

B.36. **TOKSIKOKINETIK**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD TG 417 (2010). Forsøg vedrørende et testkemikalies toksikokinetik (TK) gennemføres for at fremskaffe tilstrækkelige oplysninger om dets absorption, fordeling, biotransformation (dvs. metabolisme) og udskillelse til at relatere koncentration eller dosis til den observerede toksicitet og til at opnå en forståelse af dets toksicitetsmekanisme. TK kan hjælpe med at forstå toksikologiforsøgene ved at påvise, at forsøgsdyrene systematisk eksponeres for testkemikaliet, og ved at afdække de omsættende dele (oprindeligt kemikalie/metabolitter). Grundlæggende TK-parametre, der er fastlagt ud fra disse forsøg, giver også information om potentialet for akkumulering af testkemikaliet i væv og/eller organer og potential for induktion af biotransformation som følge af eksponeringen for testkemikaliet.

2. TK-data kan bidrage til en vurdering af relevansen og tilstrækkeligheden af toksicitetsdata vedrørende dyr med henblik på ekstrapolering til fare- og/eller risikovurderinger for mennesker. TK-forsøg kan endvidere give nyttige oplysninger til fastlæggelse af dosisniveauer til toksicitetsforsøg (lineær i forhold til ikke-lineær kinetik), virkninger af administrationsvej, biotilgængelighed og forhold vedrørende forsøgsdesign. Visse typer TK-data kan bruges til udvikling af fysiologisk baserede toksikokinetiske modeller (PBTK).

3. Metabolit-/TK-data kan anvendes på vigtige områder og kan f.eks. give forslag om mulige toksiciteter og virkningsmåder og deres sammenhæng med dosisniveau og eksponeringsvej. Metabolismedata kan desuden fremskaffe oplysninger, der kan bruges til vurdering af den toksikologiske signifikans af eksponering for eksogent producerede metabolitter af testkemikaliet.

4. Tilstrækkelige TK-data kan anvendes til støtte for yderligere accept og anvendelse af tilgange baseret på kvantitative forhold mellem struktur og aktivitet, analogislutninger eller gruppering i forbindelse med sikkerhedsevalueringen af kemikalier. Kinetikdata kan også bruges til at evaluere den toksikologiske relevans af andre forsøg (f.eks. in vivo og in vitro).

5. Medmindre en anden administrationsvej nævnes (se f.eks. afsnit 74-78), gælder denne testmetode for oral administration af testkemikaliet.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Der stilles forskellige krav og anføres forskellige behov i lovgivningerne med hensyn til måling af effektparametre og parametre vedrørende toksikokinetik for de forskellige kemikalieklasser (f.eks. pesticider, biocider og industrikemikalier). I modsætning til de fleste testmetoder beskriver denne testmetode TK-test, der involverer flere målinger og effektparametre. I fremtiden vil der muligvis blive udviklet flere nye testmetoder og/eller vejledninger, som beskriver hver effektparameter separat og i flere detaljer. For så vidt angår denne testmetode, fastlægger det enkelte lovgivningssystem, hvilke test eller vurderinger der skal gennemføres.

▼M4

7. Der er adskillige forsøg, der kan udføres for at evaluere et testkemikalies TK-opførsel i lovgivningsøjemed. Afhængigt af de konkrete lovgivningsbehov eller situationer er det dog ikke nødvendigt at udføre alle disse mulige forsøg for at evaluere et testkemikalie. Designet af TK-forsøg skal være fleksibelt og tage hensyn til karakteristika for det undersøgte testkemikalie. I nogle tilfælde skal kun et bestemt sæt spørgsmål undersøges for at behandle fare- og risikoforholdene i forbindelse med et testkemikalie. I nogle situationer indsamles TK-data i forbindelse med evalueringen i andre toksikologiforsøg. I andre situationer skal der udføres yderligere og/eller mere omfattende TK-forsøg, hvis det kræves i henhold til lovgivningen, og/eller hvis nye spørgsmål rejses under evalueringen af testkemikaliet.

8. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet samt relevante metabolitter og analoger bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Dette kan omfatte data fra andre relevante testmetoder (in vivo-forsøg, in vitro-forsøg og/eller in silico-evalueringer). Fysisk-kemiske egenskaber, såsom et testkemikalies fordelingskoefficient octanol/vand (udtrykt som log P_{OW}), pKa, vandopløselighed, damptryk og molekylvægt, kan bruges i forbindelse med planlægningen af et forsøg og fortolkning af resultater. De kan bestemmes ved hjælp af hensigtsmæssige metoder som beskrevet i de relevante testmetoder.

BEGRÆNSNINGER

9. Denne testmetode er ikke designet til at tage højde for særlige omstændigheder, f.eks. drægtige eller diegivende dyr og afkom, eller til at evaluere potentielle reststoffer i eksponerede dyr, der anvendes i fødevareproduktionen. Data fra et B.36-forsøg kan dog bruges som baggrundsinformation ved design af specifikke forsøg til sådanne undersøgelser. Denne testmetode er ikke beregnet til test af nanomaterialer. I henhold til en rapport om en foreløbig gennemgang af OECD Test Guidelines med hensyn til deres relevans for nanomaterialer kan TG 417 (svarer til denne testmetode B.36) muligvis ikke anvendes i forbindelse med nanomaterialer (1).

DEFINITIONER

10. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg.

HENSYN TIL DYREVELFÆRD

11. Vejledning om human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (2). Det anbefales, at den OECD-vejledning benyttes ved alle in vivo- og in vitro-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode.

BESKRIVELSE AF METODERNE

Pilotforsøg

12. Pilotforsøg anbefales og tilskyndes i forbindelse med valg af forsøgsparametre til TK-forsøg (f.eks. metabolisme, massebalance, analysemetoder, dosisbestemmelse, udånding af CO_2 osv.). Karakterisering af nogle af disse parametre kan betyde, at det ikke er nødvendigt at bruge radioaktivt mærkede kemikalier.

▼M4

Valg af dyr

Art

13. Den dyreart (og stamme), der bruges til TK-test, skal helst være den samme som den, der anvendes i andre toksikologiske forsøg udført med det pågældende testkemikalie. Normalt anvendes rotter, da de hyppigt anvendes i toksikologiske forsøg. Andre eller yderligere arter kan anvendes, hvis kritiske toksikologiforsøg giver bevis for signifikant toksicitet hos disse arter, eller hvis det dokumenteres, at deres toksicitet/toksikokinetik er mere relevant for mennesker. Der skal gives en begrundelse for valg af dyreart og stamme.

14. Medmindre andet nævnes, henviser denne testmetode til rotten som forsøgsdyr. Visse aspekter af metode skal muligvis ændres, hvis andre forsøgsarter bruges.

Alder og stamme

15. Der anvendes unge raske voksne dyr (normalt 6-12 uger gamle på doseringstidspunktet) (se også afsnit 13 og 14). Der skal gives en begrundelse, hvis der bruges dyr, som ikke er unge voksne. Alle dyr skal være af samme alder ved forsøgets begyndelse. Med hensyn til vægt må det enkelte dyr ikke afvige mere end ± 20 % fra testgruppens gennemsnitsvægt. Ideelt anvendes den stamme, der også blev anvendt til at etablere den toksikologiske database for testkemikaliet.

Dyrenes antal og køn

16. For hver testet dosis anvendes mindst fire dyr af et køn. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.

Opbevaring og fodringsbetingelser

17. Dyr opbevares generelt i individuelle bure i forsøgsperioden. Flere dyr i samme bur kan begrundes i særlige tilfælde. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C), og den relative fugtighed skal være 30-70 %. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

Testkemikalie

18. Et radioaktivt mærket testkemikalie med ^{14}C anvendes i forbindelse med alle aspekter af massebalance- og metabolitbestemmelse i forsøget. Hvis det kan påvises, at:

— massebalance- og metabolitbestemmelse kan evalueres tilstrækkeligt ved hjælp af det umærkede testkemikalie, og

— den analytiske specificitet og sensitivitet af den metode, der anvendes med et ikkeradioaktivt testkemikalie, er lig med eller større end den, der kan opnås med det radioaktivt mærkede testkemikalie

▼M4

er det ikke nødvendigt at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Andre radioaktive og stabile isotoper kan desuden anvendes, hvis elementet f.eks. er ansvarligt for eller indgår i den toksiske del af testkemikaliet. Hvis det er muligt, placeres det radioaktivt mærkede stof i en kernedel af det metabolsk stabile molekyle (det er ikke ombytteligt, det fjernes ikke metabolsk som CO_2, og det bliver ikke en del af organismens »one-carbon pool«). Det kan være nødvendigt at mærke flere steder eller bestemte områder af molekylet for at følge testkemikaliets metabolske skæbne.

19. Testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning analyseres ved hjælp af hensigtsmæssige metoder med henblik på at bestemme renhed og identitet. Den radioaktive renhed af det radioaktive testkemikalie skal være det højest mulige for et bestemt testkemikalie (den skal ideelt være mere end 95 %), og det skal tilstræbes at identificere urenheder, der er tilstede ved eller over 2 %. Renheden skal rapporteres sammen med identiteten og andelen af identificerede urenheder. I lovgivningsbestemmelser kan der gives yderligere vejledning i definitionen og specifikationen af testkemikalier, der består af blandinger og metoder til bestemmelse af renhed.

Valg af dosis

Pilotforsøg

20. Normalt er en enkelt oral dosis nok til pilotforsøget. Dosen skal være ikke-toksisk, men høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) og til at opfylde det anførte formål med pilotforsøget som anført i afsnit 12 i denne testmetode.

Hovedforsøg

21. Til hovedforsøgene foretrækkes mindst to doser, da oplysninger indsamlet fra mindst to dosisgrupper kan bruges som en hjælp til at fastlægge dosis i andre toksicitetsforsøg og til at foretage en dosis-responsvurdering af allerede tilgængelige toksicitetstest.

22. Hvis to doser administreres, skal begge doser være høje nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant). Information fra tilgængelige toksicitetsdata skal overvejes ved valg af dosis. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige (f.eks. fra forsøg vedrørende akut oral toksicitet med registrering af kliniske tegn på toksicitet eller fra toksicitetsforsøg med gentagen dosering), kan en værdi for den højeste dosis, der er lavere end LD_{50}- (oral og dermal administration) eller LC_{50} (inhalation)-estimatet eller lavere end den laveste værdi af det estimerede interval for akut toksicitet, overvejes. Den laveste dosis skal være en brøkdel af den højeste dosis.

23. Hvis kun et dosisniveau undersøges, skal dosen ideelt være høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) uden at producere synlig toksicitet. Der gives en begrundelse, hvis der ikke medtages et andet dosisniveau.

24. Hvis virkningen af dosen på de kinetiske processer skal bestemmes, er to doser muligvis ikke nok, og mindst én dosis skal være tilstrækkeligt høj til at mætte disse processer. Hvis området under koncentration-tidskurven for plasma (AUC) ikke er lineært mellem de to dosisniveauer, der er anvendt i hovedforsøget, er det en stærk indikation af, at mætning af en eller flere af de kinetiske processer sker et sted mellem de to dosisniveauer.

▼M4

25. For testkemikalier af lav toksicitet bør en maksimal dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt (oral og dermal administration) anvendes (for oplysninger om inhalation henvises til kapitel B.2 i dette bilag; denne dosis overstiger typisk ikke 2 mg/l). Kemikaliespecifikke overvejelser kan gøre det nødvendigt at anvende en højere dosis, afhængigt af lovgivningen. Valg af dosis skal altid begrundes.

26. Toksikokinetiske data og data om fordeling i væv ved enkelt dosis kan være nok til at bestemme potentialet for akkumulering og/eller persistens. Under visse omstændigheder kan gentagen dosisadministration dog være nødvendig i) for i yderligere detaljer at afdække potentialet for akkumulering og/eller persistens eller ændringer i TK (dvs. enzyminduktion og -inhibition) eller ii) for at opfylde de gældende lovgivningskrav. Hvis et forsøg omfatter gentagen dosering, er det normalt tilstrækkeligt at anvende den lave dosis, men under visse omstændigheder kan det være nødvendigt også at anvende en høj dosis (se også afsnit 57).

Administration af testkemikalie

27. Testkemikaliet skal opløses eller suspenderes homogent i det vehikel, der også blev anvendt til de andre toksicitetsforsøg med anvendelse af oral sonde, der er udført med testkemikaliet, hvis oplysninger om vehiklet er tilgængelige. Der gives en begrundelse for valg af vehikel. Valg af vehikel og doseringsvolumen skal være en del af forsøgsdesignet. Testkemikaliet administreres sædvanligvis via sonde. Administration med gelatinekapsler eller iblandet foderet kan være bedre i visse situationer (begrundelse gives i begge tilfælde). Den faktiske dosis, der er administreret til hvert dyr, bekræftes.

28. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen via oral sonde, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse, typen af dosisvehikel, og om dyrene haft adgang til foder inden administration af testkemikaliet. Der gives en begrundelse for administration eller begrænsning af foder inden dosering. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt for både vandige og ikke-vandige vehikler. Dosisvolumen må normalt ikke overstige 10 ml/kg kropsvægt for gnavere. Volumen af vehikler, der anvendes i forbindelse med mere lipofile testkemikalier, kan starte ved 4 ml/kg kropsvægt. Når daglig faste er kontraindiceret, bør lavere dosisvolumen (f.eks. 2-4 ml/kg kropsvægt) overvejes ved gentagen dosering. Når det er muligt, bør det overvejes at bruge et dosisvolumen svarende til det, der er anvendt i andre orale sondeforsøg med testkemikaliet.

29. Intravenøs (IV) administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i blod og/eller excreta kan anvendes til at bestemme biotilgængelighed eller relativ oral absorption. Ved et IV-forsøg administreres en enkelt dosis (normalt svarende til, men ikke højere end den laveste orale dosis) af testkemikaliet ved hjælp af et hensigtsmæssigt vehikel. Dette materiale bør administreres i et passende volumen (f.eks. 1 ml/kg kropsvægt) på det valgte administrationssted på mindst fire dyr af det mest egnede køn (begge køn kan anvendes, hvis det er begrundet, se afsnit 16). En fuldt opløst eller suspenderet dosistilberedning er nødvendig ved IV-administration af testkemikaliet.. Vehiklet til IV-administration må ikke opvirke blodintegriteten eller blodgennemstrømningen. Ved infusion af testkemikaliet med en infusionspumpe rapporteres infusionshastigheden, som skal være den samme for alle dyr. Bedøvelse anvendes, hvis et kateter indsættes i halsvenen (til administration af testkemikaliet og/eller udtagning af blod), eller hvis

▼M4

femoralarterien anvendes til administration. Typen af bedøvelse bør overvejes, da den kan påvirke toksikokinetikken. Dyrene skal have mulighed for at restituere sig tilstrækkeligt inden administration af testkemikaliet og vehiklet.

30. Andre administrationsveje, f.eks. dermal applikation og inhalation (se afsnit 74-78), kan anvendes i forbindelse med visse testkemikalier under hensyntagen til deres fysisk-kemiske egenskaber og menneskers forventede anvendelse eller eksponering.

Målinger

Massebalance

31. Massebalance bestemmes ved at lægge den procentdel af den administrerede (radioaktive) dosis, der udskilles i urin, fæces og udåndet luft, sammen med den procentdel, der er til stede i væv, resten af kadaveret og vaskevand fra bure (se afsnit 46). Generelt vurderes en total genfinding af det administrerede testkemikalie (radioaktivitet) på > 90 % at være tilstrækkelig.

Absorption

32. Der kan fås en indledende estimering af absorptionen ved at ekskludere procentdelen af dosen i mave-tarmkanalen og/eller fæces fra bestemmelsen af massebalancen. Se afsnit 33 for oplysninger om beregning af den procentvise absorption. Se afsnit 44-49 for oplysninger om undersøgelse af excreta. Hvis den præcise absorptionsgrad efter oral administration ikke kan bestemmes ud fra massebalanceforsøg (f.eks. hvis mere end 20 % af den administrerede dosis er til stede i fæces), kan yderligere undersøgelser være nødvendige. Disse forsøg kan omfatte enten 1) oral administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i galde eller 2) oral og intravenøs administration af testkemikaliet og måling af det nettovolumen af testkemikalie, der er til stede i urin plus udåndet luft plus kadaver ved hver af de to administrationsveje. I begge forsøgsdesign foretages måling af radioaktivitet som en surrogatmetode til kemikaliespecifik analyse af testkemikaliet plus metabolitter.

33. Hvis udskillelse i galde undersøges, anvendes oftest oral administration. I dette forsøg lægges et kateter i galdegangen på mindst fire dyr af det mest egnede køn (eller begge køn, hvis det er begrundet), og en enkelt dosis af testkemikaliet administreres. Efter administration af testkemikaliet overvåges udskillelsen af radioaktivitet/testkemikalie i galde så længe som nødvendigt for at anslå den procentdel af den administrerede dosis, der udskilles ad denne vej, og denne værdi kan bruges til direkte at beregne den orale absorptionsgrad:

$$\text{Procent absorption} = \begin{array}{l}(\text{mængde i galde} + \text{urin} + \text{udåndet luft} \\ +\text{kadaver uden indhold i mave} - \text{tarmkanal}) \\ /\text{administreret mængde} \times 100\end{array}$$

34. I nogle testkemikalieklasser kan der ske direkte sekretion af den absorberede dosis på tværs af tarmmembraner. I sådanne tilfælde er målingen af den procentvise dosis i fæces efter en oral dosis via kateter i rottens galdekanal ikke repræsentativ for den uabsorberede dosis. Hvis tarmsekretion vurderes at forekomme, anbefales det, at den absorberede procentdel af dosis baseres på den absorption, der beregnes ved at sammenligne udskillelse efter oral administration med udskillelse efter intravenøs administration (intakt rotte eller rotte med kateter i galdekanal) (se afsnit 35). Hvis kvantificering af tarmsekretion vurderes at være nødvendig, bør udskillelse i galdegangen hos rotten med kateter i galdekanalen måles efter intravenøs dosisadministration.

▼M4

Biotilgængelighed

35. Biotilgængelighed kan bestemmes ud fra plasma-/blodkinetikken for de orale og intravenøse grupper (se afsnit 50-52) ved hjælp af specifik kemisk analyse af testkemikaliet og/eller relevante metabolitter, og et radioaktivt mærket testkemikalie er derfor ikke påkrævet. Beregningen af testkemikaliets eller relevante metabolitters biotilgængelighed (F) foretages derefter på følgende måde:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_{IV}/Dosis_{exp})$$

hvor AUC er området under koncentration-tidskurven for plasma, og exp er den eksperimentelle administrationsvej (oral, dermal eller via inhalation).

36. I forbindelse med risikovurdering af systemiske virkninger foretrækkes generelt biotilgængelighed af den toksiske komponent generelt frem for den procentvise absorption, når systemiske koncentrationer fra dyreforsøg sammenlignes med analoge bioovervågningsdata fra undersøgelser af erhvervsmæssig eksponering. Situationen kan blive mere kompleks, hvis doserne er i det ikke-lineære område, så det er vigtigt at den toksikokinetiske screening udpeger doser i det lineære område.

Fordeling i væv

37. Kendskab til fordelingen i væv af et testkemikalie og/eller dets metabolitter er afgørende for at kunne identificere målvæv og forstå de bagvedliggende toksicitetsmekanismer og for at få oplysninger om testkemikaliets potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Procentdelen af den samlede (radioaktive) dosis i væv og resten af kadaveret bør som minimum måles ved afslutningen af udskillelsesforsøget (f.eks. op til syv dage efter dosis eller mindre afhængigt af testkemikaliets specifikke opførsel). Hvis testkemikalie ikke spores i væv ved forsøgsafslutning (f.eks. fordi testkemikaliet er blevet elimineret inden forsøgsafslutning på grund af en kort halveringstid), bør det omhyggeligt sikres, at data ikke fejlfortolkes. I en sådan situation undersøges fordelingen i væv på det tidspunkt, hvor koncentrationen af testkemikaliet (og/eller dets metabolit) topper i plasma/blod (T_{max}), eller hvor udskillelse i urinen topper, alt efter hvad der er relevant (se afsnit 38). Det kan desuden være nødvendigt at indsamle væv på andre tidspunkter med henblik på at bestemme fordelingen i væv af testkemikaliet og/eller dets metabolitter, evaluere betydningen af tid (hvis relevant), hjælpe med at bestemme massebalance og/eller som krævet af en kompetent myndighed. Væv, der indsamles, omfatter lever, fedt, mave-tarmkanal, nyre, milt, fuldblod, resterende kadaver, væv fra målorganer og andet væv (f.eks. skjoldbruskkirtel, erytrocytter, kønsorganer, hud, øjne (især fra pigmenterede dyr) af potentiel signifikans for den toksikologiske evaluering af testkemikaliet. Analyse af yderligere væv på samme tidspunkter bør overvejes for at udnytte dyrene mest muligt, og hvis målorgantoksicitet observeres i forsøg vedrørende subkronisk eller kronisk toksicitet. Den (radioaktive) restkoncentration og forholdet mellem væv og plasma (blod) rapporteres også.

38. Evaluering af fordelingen i væv på flere tidspunkter, f.eks. tidspunktet for spidskoncentration i plasma/blod (dvs. T_{max}) eller spidsudskillelse i urin, fremskaffet fra de forskellige forsøg vedrørende plasma-/blodkinetik eller udskillelse, kan også være nødvendig eller kræves af en kompetent myndighed. Disse oplysninger kan bruges til at forstå toksicitet og testkemikaliets potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Udvælgelsen af prøver skal begrundes. Prøver til analyse skal generelt være de samme som ovennævnte (se afsnit 37).

▼M4

39. Kvantificering af radioaktivitet til forsøg vedrørende fordeling i væv kan udføres ved hjælp af dissekering, homogenisering, forbrænding og/eller opløsning af organer efterfulgt af væskescintillationstælling af opsamlede rester. Bestemte teknikker, som er på forskellige udviklingstrin, f.eks. kvantitativ helkropsautoradiografi og mikroskopisk autoradiografi af receptor, kan vise sig at være nyttige til bestemmelse af fordelingen af et testkemikalie i organer og/eller væv (3) (4).

40. For andre eksponeringsveje end oral indsamles og analyseres specifikke væv, f.eks. lunger i inhalationsforsøg og hud i dermale forsøg. Se afsnit 74-78.

Metabolisme

41. Excreta (og plasma, hvis relevant) indsamles til identifikation og kvantificering af uforandret testkemikalie og uforandrede metabolitter som beskrevet i afsnit 44-49. Pooling af excreta med henblik på at lette identifikationen af metabolitter i en bestemt dosisgruppe accepteres. Det anbefales, at metabolitter fra hver tidsperiode profileres. Hvis det ikke er muligt på grund af manglende prøver og/eller radioaktivitet, kan pooling af urin og fæces på tværs af flere tidspunkter accepteres, men pooling på tværs af køn eller doser accepteres ikke. Der anvendes hensigtsmæssige kvalitative og kvantitative metoder til at analysere urin, fæces, udåndet radioaktivitet fra behandlede dyr og galde, hvis det er relevant.

42. Der bør ydes en rimelig indsats for at identificere alle metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, og fastlægge et metabolisk system for testkemikaliet. Testkemikalier, der er karakteriseret i excreta som bestående af 5 % eller mere af den administrerede dosis, identificeres. Identifikation betyder den præcise strukturelle bestemmelse af komponenter. Identifikation opnås typisk ved at bruge co-kromatografi af metabolitten med kendte standarder ved hjælp af to forskellige systemer eller ved at bruge teknikker, der kan foretage positiv strukturel identifikation, som f.eks. massespektroskopi, kernemagnetisk resonans (NMR) osv. Hvis co-kromatografi anvendes, kan kromatografiske teknikker, der anvender samme stationære fase med to forskellige opløsningsmiddelsystemer, ikke anvendes til at foretage verifikation af metabolitidentitet ved hjælp af to teknikker, da metoderne ikke er uafhængige. Identifikation ved hjælp af co-kromatografi foretages ved hjælp af to forskellige og analytisk uafhængige systemer, f.eks. tyndtlagskromatografi (reverse og normal fase) (TLC) og højtydende væskekromatografi (HPLC). Hvis den kromatografiske adskillelse er af passende kvalitet, er yderligere bekræftelse ved hjælp af spektroskopi ikke nødvendig. Alternativt kan entydig identifikation også opnås ved at bruge metoder, der frembringer strukturelle oplysninger, som f.eks. væskekromatografi-massespektroskopi (LC-MS) eller væskekromatografi/tandem massespektroskopi (LC-MS/MS), gaskromatografi/massespektroskopi (GC-MS) og NMR-spektrometri.

43. Hvis identifikation af metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, ikke er mulig, gives der en begrundelse/forklaring i den endelige rapport. Det kan være hensigtsmæssigt at identificere metabolitter, som udgør mindre end 5 % af den administrerede dosis, for at få en bedre forståelse af metaboliseringsvejen i forbindelse med fare- og/eller risikovurderingen af testkemikaliet. Strukturel bekræftelse skal så vidt muligt gives. Det kan omfatte profilering i plasma eller blod eller andet væv.

▼M4

Udskillelse

44. Hastigheden og graden af udskillelse af den administrerede dosis bestemmes ved at måle den procentdel af dosen (radioaktiv), der er genfundet i urin, fæces og udåndet luft. Disse data vil også medvirke til at bestemme massebalance. De testkemikaliekvantiteter (radioaktivitet), der er elimineret i urin, fæces og udåndet luft, bestemmes med passende tidsintervaller (se afsnit 47-49). Forsøg med gentagne doser designes, så data om udskillelse kan indsamles med henblik på at opfylde målene i afsnit 26. Derved kan forsøgene sammenlignes med enkeltdosisforsøg.

45. Hvis et pilotforsøg har vist, at der ikke udskilles en signifikant mængde af testkemikaliet (radioaktivitet) (i henhold til afsnit 49) gennem udåndet luft, er det ikke nødvendigt at indsamle udåndet luft i hovedforsøget.

46. Hvert dyr placeres i et separat metabolismebur med henblik på indsamling af excreta (urin, fæces og udåndet luft). Efter hver indsamlingsperiode (se afsnit 47-49) skylles metabolismeburene med opløsningsmiddel (»burvask«) for at sikre maksimal genfinding af testkemikaliet (radioaktivitet). Indsamlingen af excreta afsluttes på dag 7, eller når mindst 90 % af den administrerede dosis er genfundet, alt efter hvad der forekommer først.

47. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i urin bestemmes på mindst to tidspunkter på den første indsamlingsdag, hvoraf det ene skal være 24 timer efter dosering, og derefter dagligt indtil forsøgsafslutning. Der bør vælges mere end to indsamlingspunkter på dag 1 (f.eks. ved 6, 12 og 24 timer). Resultaterne af pilotforsøg analyseres for oplysninger om alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af indsamlingstidsplan.

48. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i fæces bestemmes dagligt fra og med 24 timer efter dosering indtil forsøgsafslutning, medmindre pilotforsøg påviser alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af alternative indsamlingstidsplaner.

49. Indsamlingen af udåndet CO_2 og andre flygtige materialer kan afbrydes i et forsøg, hvis mindre end 1 % af den administrerede dosis findes i den udåndede luft i løbet af en indsamlingsperiode på 24 timer.

Forsøg vedrørende tidsforløb

Plasma-/blodkinetik

50. Formålet med disse forsøg er at opnå estimater af grundlæggende TK-parametre [f.eks. C_{max}, T_{max}, halveringstid ($t_{1/2}$), AUC] for testkemikaliet. Disse forsøg kan gennemføres med en dosis eller mere sandsynligt med to eller flere doser. Dosis fastlægges ud fra karakteren af forsøget og/eller det undersøgte væv. Der skal evt. bruges kinetiske data til at afklare spørgsmål, som f.eks. testkemikaliets biotilgængelighed, og/eller afklare virkningen af dosen på clearance (f.eks. at afklare, om clearance mættes på en dosisafhængig måde).

51. Til disse forsøg anvendes der mindst fire dyr pr. køn pr. dosisgruppe. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.

▼M4

52. Efter administration af testkemikaliet (radioaktivt mærket) udtages blodprøver fra hvert dyr på passende tidspunkter ved hjælp af en hensigtsmæssig prøveudtagningsteknik. Volumenet og antallet af blodprøver, der kan udtages pr. dyr, kan være begrænset af potentielle virkninger af gentagen prøvetagning på dyrets sundhed/fysiologi og/eller analysemetodens sensitivitet. Prøver analyseres for hvert enkelt dyr. Under visse omstændigheder (f.eks. karakterisering af metabolitter) kan det være nødvendigt at samle prøver fra flere dyr i en pool. Poolede prøver identificeres tydeligt, og der gives en forklaring. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, kan analysen af total tilstedeværende radioaktivitet være tilstrækkelig. I så fald analyseres den totale radioaktivitet i fuldblod og plasma eller plasma og røde blodlegemer, således at blod-/plasmaforholdet kan beregnes. Under andre omstændigheder kan mere specifikke undersøgelser, der kræver identifikation af moderstof og/eller metabolitter eller vurdering af proteinbinding, være nødvendige.

Kinetik for andet væv

53. Formålet med disse forsøg er at fremskaffe oplysninger om tidsforløb for at afklare spørgsmål vedrørende f.eks. toksisk virkningsmåde, bioakkumulering og biopersistens via bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i forskellige væv. Valget af væv og antallet af tidspunkter, der evalueres, afhænger af det undersøgte væv og den toksikologiske database for testkemikaliet. Designet af disse kinetiske forsøg vedrørende andet væv baseres på information fremskaffet som beskrevet i afsnit 37-40. Forsøgene kan omfatte enkeltdosering eller gentagen dosering. Der gives en detaljeret begrundelse for den valgte tilgang.

54. Årsagerne til at udføre kinetiske forsøg med andet væv kan omfatte:

— bevis for forlænget halveringstid i blod, hvilket antyder mulig akkumulering af testkemikaliet i forskellige væv

— ønske om at undersøge, om der er opnået et steady state-niveau i bestemte væv (i forsøg med gentagen dosering, hvor der er opnået et tilsyneladende steady state-niveau for testkemikaliet i blod, kan man f.eks. også ønske at bekræfte, at der er opnået et steady state-niveau i målvæv).

55. For disse typer forsøg vedrørende tidsforløb administreres en passende dosis af testkemikaliet til mindst fire dyr pr. dosis pr. tidspunkt, og tidsforløbet for fordelingen i de udvalgte vævstyper overvåges. Der anvendes kun ét køn, medmindre der observeres kønsspecifik toksicitet. Om total radioaktivitet eller moderstof og/eller metabolitter analyseres, afhænger af det undersøgte spørgsmål. Fordeling i væv vurderes ved hjælp af hensigtsmæssige teknikker.

Enzyminduktion/-inhibition

56. Forsøg, der omhandler de mulige virkninger af enzyminduktion/-inhibition eller biotransformation af testkemikaliet i løbet af forsøget, kan være nødvendige i følgende tilfælde:

1) Tilgængelige beviser indicerer en sammenhæng mellem testkemikaliets biotransformation og øget toksicitet.

2) De tilgængelige toksicitetsdata indicerer en ikke-lineær sammenhæng mellem dosis og metabolisme.

▼M4

3) Resultaterne af forsøg vedrørende identifikation af metabolitter påviser en potentielt toksisk metabolit, der muligvis er blevet produceret af en enzymbane, der er induceret af testkemikaliet.

4) Til forklaring af virkninger, der påstås at hænge sammen med enzyminduktionsfænomener.

5) Hvis toksikologisk signifikante forandringer i testkemikaliets metaboliske profil observeres via in vitro- eller in vivo-eksperimenter med forskellige arter eller under forskellige betingelser, skal de involverede enzymer muligvis karakteriseres (f.eks. fase I-enzymer, som f.eks. isoenzymer af det cytochrom P450-afhængige monooxygenasesystem, fase II-enzymer, som f.eks. isoenzymer af sulfotransferase eller uridindiphosphat-glucuronosyltransferase, eller andre relevante enzymer). Disse oplysninger kan bruges til at evaluere relevansen af ekstrapolering mellem arter.

57. Der skal anvendes hensigtsmæssige forsøgsprotokoller med passende validering og begrundelse til at evaluere ændringer i TK relateret til testkemikaliet. Eksempler på forsøgsdesign omfatter gentagen dosering med ikkemærket testkemikalie efterfulgt af en enkelt radioaktivt mærket dosis på dag 14 eller gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie og prøvetagning på dag 1, 7 og 14 med henblik på at bestemme metabolitprofiler. Gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie kan også give oplysninger om bioakkumulering (se afsnit 26).

SUPPLERENDE TILGANGE

58. Supplerende tilgange ud over de in vivo-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode, kan give nyttige oplysninger om absorption, fordeling, metabolisme eller eliminering af et testkemikalie i visse arter.

Anvendelse af in vitro-oplysninger

59. Flere spørgsmål om metabolismen af testkemikaliet kan undersøges i in vitro-forsøg baseret på hensigtsmæssige testsystemer. Nyligt isolerede eller dyrkede hepatocytter og subcellulære fraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol- eller S9-fraktion) fra leveren kan bruges til at studere mulige metabolitter. Lokal metabolisme i målorganet, f.eks. lunge, kan være interessant i forbindelse med risikovurdering. Til sådanne formål kan mikrosomfraktioner af målvæv være anvendelige. Forsøg med mikrosomer kan bruges til at undersøge potentielle køns- og livsfaseforskelle og karakterisere enzymparametre (K_m og V_{max}), som kan medvirke til at vurdere dosisafhængigheden af metabolisme i forhold til eksponeringsniveauer. Mikrosomer kan desuden hjælpe med at identificere de specifikke mikrosomenzymer, der er involveret i metabolismen af testkemikaliet, hvilket kan være relevant ved ekstrapolering mellem arter (se også afsnit 56). Potentialet for induktion af biotransformation kan også undersøges ved hjælp af subcellulære leverfraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol) fra dyr, der på forhånd er behandlet med det undersøgte testkemikalie, in vitro via forsøg med hepatocytinduktion eller fra specifikke cellelinjer, der udtrykker relevante enzymer. Under visse omstændigheder og hensigtsmæssige forhold kan det overvejes at anvende sub-cellulære fraktioner af menneskeligt væv til at bestemme potentielle artsforskelle, hvad angår biotransformation. Resultaterne af in vitro-undersøgelser kan også bruges til at udvikle PBTK-modeller (5).

▼M4

60. In vitro-forsøg vedrørende dermal absorption kan give yderligere oplysninger, som kan karakterisere absorption (6).

61. Primære cellekulturer fra leverceller og friske vævsudsnit kan anvendes til at undersøge samme spørgsmål som levermikrosomer. I nogle tilfælde kan specifikke spørgsmål besvares ved hjælp af cellelinjer med defineret udtryk af det relevante enzym eller ved hjælp af konstruerede cellelinjer. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at undersøge inhibitionen og induktionen af specifikke cytochrom P450-isozymer (f.eks. CYP1A1, 2E1, 1A2 m.fl.) og/eller fase II-enzymer af moderstoffet ved hjælp af in vitro-forsøg. De indhentede informationer kan bruges i forbindelse med stoffer med tilsvarende struktur.

Brug af toksikokinetiske data fra toksicitetsforsøg som supplerende oplysninger

62. Analyse af blod-, vævs- eller excretaprøver fremskaffet i forbindelse med gennemførelsen af andre toksicitetsforsøg kan tilvejebringe data om biotilgængelighed, ændringer i plasmakoncentration over tid (AUC, C_{max}), bioakkumuleringspotentiale, clearance-hastigheder og køns- eller livsfasebetingede ændringer i metabolisme og kinetik.

63. Overvejelsen af forsøgsdesignet kan omfatte besvarelse af spørgsmål vedrørende: mætning af absorptions-, biotransformations eller udskillelsesveje ved højere dosisniveauer, funktionen af nye metaboliske veje ved højere doser og begrænsningen af toksiske metabolitter til højere doser.

64. Andre overvejelser i forbindelse med farevurdering kan omfatte spørgsmål, som f.eks.:

— aldersrelateret sensitivitet som følge af forskelle i blod-hjernebarrierens tilstand samt nyre- og eller detoksificeringskapaciteten

— sensitivitet for delpopulation som følge af forskelle i biotransformationskapacitet eller andre TK-forskelle

— grad af eksponering af foster ved transplacental overførsel af kemikalier eller af den nyfødte via laktation.

Brug af toksikokinetisk modellering

65. Toksikokinetiske modeller kan bruges til forskellige formål i forbindelse med fare- og risikovurdering, som f.eks. forudsigelse af systemisk eksponering og intern vævsdosis. Specifikke spørgsmål vedrørende virkningsmåde kan undersøges, og disse modeller kan danne grundlaget for ekstrapolering på tværs af arter, eksponeringsveje, doseringsmønstre og risikovurdering for mennesker. Data, som kan bruges til at udvikle PBTK-modeller for et testkemikalie for en given art, omfatter 1) fordelingskoefficienter, 2) biokemiske konstanter og fysiologiske parametre, 3) absorptionsparametre, der er specifikke for eksponeringsvejen, og 4) kinetiske in vivo-data til modelevaluering [f.eks. clearanceparametre for relevante (> 10 %) udskillelsesveje samt K_m og V_{max} for metabolisme]. De forsøgsdata, der bruges i forbindelse med modeludvikling, skal genereres med videnskabeligt forsvarlige metoder, og modelresultaterne skal evalueres. Parametre, der er specifikke for testkemikaliet og arten, f.eks. absorptionshastigheder og konstanter for fordeling mellem blod/væv og metabolisk hastighed, bestemmes ofte for at lette udvikling af generelle eller fysiologisk baserede modeller (7).

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

66. Forsøgsrapporten bør indeholde en indholdsfortegnelse.

Selve rapporten

67. Selve rapporten skal indeholde de oplysninger, der er omfattet af denne testmetode, opdelt i følgende kapitler og afsnit:

Resumé

68. Dette afsnit af forsøgsrapporten skal indeholde et resumé af forsøgsdesignet og en beskrivelse af de anvendte metoder. I afsnittet fremhæves også de centrale fund med hensyn til massebalance, karakter og omfang af metabolitter, vævsrester, clearance-hastighed, bioakkumuleringspotentiale, kønsbetingede forskelle osv. Resuméet skal være så detaljeret, at fundene kan evalueres.

Indledning

69. I dette afsnit af rapporten anføres forsøgsmål, -rationale og -design, og der gives relevante referencer og baggrundsoplysninger.

Materialer og metoder

70. Dette afsnit i rapporten skal indeholde detaljerede beskrivelser af alle relevante forhold, herunder:

a) Testkemikalie

I dette underafsnit identificeres testkemikaliet: kemisk navn, molekylærstruktur, kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af dets kemiske sammensætning, kemisk renhed, samt type og kvantiteter af evt. urenheder, hvis det er muligt. Det skal også indeholde oplysninger om fysisk-kemiske egenskaber, herunder fysisk tilstand, farve, opløselighed og/eller fordelingskoefficient, stabilitet og ætsende virkning, hvis det er relevant. Hvis det er relevant, anføres oplysninger om isomere. Hvis testkemikaliet er radioaktivt mærket, anføres følgende oplysninger om følgende i dette underafsnit: radionukleidtype, mærkets placering, specifik aktivitet og radiokemisk renhed.

Evt. vehikel, fortyndingsmidler, suspensionsmidler og blødgøringsmidler eller andre materialer, der anvendes til administration af testkemikaliet, anføres eller beskrives.

b) Forsøgsdyr

I dette afsnit anføres oplysninger om forsøgsdyrene, herunder udvælgelse af og begrundelse for art, stamme og alder ved forsøgets begyndelse, køn samt kropsvægt, sundhedsstatus og dyreopdræt og -sundhed.

c) Metoder

Dette afsnit skal indeholde detaljer om det anvendte forsøgsdesign og de anvendte metoder. Det skal bl.a. indeholde:

1) en begrundelse for evt. ændring af eksponeringsvej og eksponeringsbetingelser

▼M4

2) en begrundelse for valget af dosisniveauer

3) en beskrivelse af evt. pilotforsøg, der er indgår i forsøgsdesignet for de opfølgende forsøg; baggrundsdata for pilotforsøg indgives

4) en beskrivelse af tilberedningen af doseringsopløsningen og typen af evt. opløsningsmiddel eller vehikel

5) antal behandlingsgrupper og dyr i hver gruppe

6) dosisniveauer og -volumen (og dosens specifikke aktivitet, når radioaktivitet anvendes)

7) administrationsveje og -metoder

8) doseringshyppighed

9) evt. fasteperiode

10) total radioaktivitet pr. dyr

11) håndtering af dyr

12) prøvetagning og -håndtering

13) analysemetoder anvendt til separation, kvantificering og identifikation af metabolitter

14) påvisningsgrænse for de anvendte metoder

15) andre anvendte forsøgsmålinger og -fremgangsmåder (herunder validering af metoder til metabolitanalyse).

d) Statistisk analyse:

Hvis statistisk analyse bruges til at analysere forsøgsfund, skal rapporten indeholde tilstrækkelige oplysninger om den anvendte analysemetode og det anvendte computerprogram, således at en uafhængig reviewer/statistiker kan revurdere og gentage analysen.

Hvis der bruges systemer, som modellerer forsøg, som f.eks. PBTK, skal præsentationen af modeller indeholder en udførlig beskrivelse af modellen, således at der kan foretages en uafhængig gentagelse og validering af modellen (se afsnit 65 og tillæg: Definitioner).

Resultater

71. Alle data opsummeres og opstilles i tabelform med relevant statistisk evaluering og beskrives i afsnittets tekst. Data om radioaktivitetsmåling opsummeres og fremlægges, for så vidt det er relevant for forsøget, typisk som mikrogram- eller milligram-ækvivalenter pr. prøvemasse, men andre enheder kan anvendes. I dette afsnit indsættes grafiske illustrationer af fundene, reproduktioner af repræsentative kromatografi- og spektrometridata, identifikation/kvantificering af metabolitter og foreslåede metaboliske veje, herunder metabolitternes molekylærstruktur. Følgende oplysninger angives desuden i dette afsnit, for så vidt de er relevante:

1) kvantitet og procentdel af genfunden radioaktivitet i urin, fæces, udåndet luft samt urin og fæces i vaskevand fra bure

— I forbindelse med dermale forsøg angives også data om genfinding af testkemikaliet fra behandlet hud, hudvask og tilbageværende radioaktivitet i hudbeskyttelse og metabolismebur samt resultater af forsøg med hudvask. Se afsnit 74-77 for en yderligere diskussion.

▼M4

— I forbindelse med inhalationsforsøg anføres også data om genfinding af testkemikaliet i lunger og nasale væv (8). Se afsnit 78 for en yderligere diskussion

2) fordeling i væv rapporteret som procentdel af administreret dosis og koncentration (mikrogram-ækvivalenter pr. g væv), og forhold mellem væv og blod eller væv og plasma

3) materialebalance udviklet fra hvert forsøg, der omfatter analyse af kropsvæv og excreta

4) plasmakoncentrationer og toksikokinetiske parametre (biotilgængelighed, AUC, Cmax, Tmax, clearance og halveringstid) efter administration via de relevante eksponeringsveje

5) hastighed og grad af absorption af testkemikaliet efter administration via de relevante eksponeringsveje

6) kvantiteter af testkemikaliet og metabolitter (rapporteret som en procentdel af den administrerede dosis) indsamlet i excreta

7) reference til data i tillæg, der indeholder data om individuelle dyr for alle undersøgte effektparametre (f.eks. dosisadministration, genfunden procent, koncentrationer, TK-parametre osv.)

8) illustration af de foreslåede metaboliske veje og metabolitternes molekylærstruktur.

Diskussion og konklusioner

72. I dette afsnit skal forfatterne:

1) anføre en foreslået metabolisk vej baseret på resultaterne af metabolismen og elimineringen af testkemikaliet

2) diskutere potentielle arts- og kønsspecifikke forskelle med hensyn til testkemikaliets eliminering og/eller biotransformation

3) opstille data om og diskutere identifikationen og omfanget af metabolitter, clearance-hastigheder, bioakkumuleringspotentiale og koncentration af moderstof- og/eller metabolitrester i væv samt mulige dosisbetingede ændringer i TK-parametre, for så vidt det er relevant

4) i dette afsnit anføre alle relevante TK-data indhentet i forbindelse med gennemførelsen af toksicitetsforsøg

5) angive en præcis konklusion, der underbygges af forsøgsfundene

6) efter behov indsætte yderligere relevante afsnit.

73. I yderligere afsnit indsættes understøttende bibliografiske oplysninger, tabeller, figurer, tillæg osv.

▼M4

ALTERNATIVE EKSPONERINGSVEJE

Dermal

Dermal behandling

74. I dette afsnit gives der specifikke oplysninger om undersøgelsen af toksikokinetikken for testkemikaliet ved dermal eksponering. Med hensyn til dermal absorption henvises der til kapitel B.44 i dette bilag [Hudabsorption: in vivo-metode (9)]. I forbindelse med andre effektparametre, f.eks. fordeling og metabolisme, kan denne testmetode B.36 anvendes. Der anvendes et eller flere dosisniveauer ved dermal behandling. Testkemikaliet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Dosisniveauer vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Faktorer, der kan tages i betragtning ved valg af dermal dosis, omfatter forventet human eksponering og/eller doser, hvor toksicitet er observeret i andre forsøg vedrørende dermal toksicitet. De dermale doser skal om nødvendigt opløses i et egnet vehikel og påføres i en mængde, der er tilstrækkelig til at levere doserne. Kort før forsøget indledes, klippes forsøgsdyrene på ryggen. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af kroppens overflade skal gøres klar til påføring af testkemikaliet. I tilfælde af stærkt toksiske kemikalier kan området være mindre end 10 %, men en så stor del af området som muligt bør dækkes med et tyndt og ensartet lag. Det samme behandlingsområde anvendes til alle dermale testgrupper. De behandlede områder beskyttes med en passende kappe, som fastgøres. Dyrene anbringes enkeltvis i bure.

75. Der gennemføres et forsøg med hudvask med henblik på at vurdere den mængde, af den anvendte dosis af testkemikaliet, der kan fjernes fra huden ved at vaske det behandlede hudområde med mild sæbe og vand. Dette forsøg kan også hjælpe med at bestemme massebalancen, når testkemikaliet administreres ved dermal applikation. I dette forsøg med hudvask påføres en enkelt dosis af testkemikaliet på to dyr. Dosis vælges i overensstemmelse med afsnit 23 i denne testmetode (se også afsnit 76 for en diskussion af hudkontakttid). De mængder af testkemikaliet, der genfindes i vaskevandet, bestemmes med henblik på at vurdere, hvor effektivt testkemikaliet fjernes ved vask.

76. Medmindre det ikke er muligt på grund af ætsning, påføres testkemikaliet huden og forbliver der i mindst seks timer. Når beskyttelseskappen fjernes, vaskes det behandlede område ved hjælp af den fremgangsmåde, der er beskrevet i forsøget med hudvask (se afsnit 75). Både beskyttelseskappe og vaskevand analyseres for rester af testkemikaliet. Ved afslutningen af forsøgene aflives alle dyrene humant i overensstemmelse med (2), og den behandlede hud fjernes. Et relevant udsnit af den behandlede hud analyseres for rester af testkemikaliet (radioaktivitet).

77. I forbindelse med toksikokinetisk vurdering af lægemidler kan der i overensstemmelse med den gældende lovgivning anvendes forskellige fremgangsmåder.

▼M4

Inhalation

78. Der anvendes en enkelt koncentration (eller flere, hvis det er nødvendigt) af testkemikaliet. Koncentrationerne vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Inhalationsbehandlinger gennemføres ved hjælp af et apparat med en »næsekegle« eller anordning til behandling af kun hovedet for at forhindre absorption via andre eksponeringsveje (8). Hvis andre betingelser for inhalationseksponering anvendes, dokumenteres begrundelsen for ændringen. Varigheden af eksponering ved inhalation defineres. Eksponeringsvarigheden er typisk 4-6 timer.

LITTERATUR:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

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

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Kapitel B.45 i dette bilag, Hudabsorption: in vitro-metode.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Genève, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

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

(9) Kapitel B.44 i dette bilag, Hudabsorption: in vivo-metode.

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

(11) Gibaldi M og Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Tillæg

DEFINITIONER

Absorption: proces(ser) for optagelse af kemikalier i eller på tværs af væv. Absorption henviser til moderstoffet og alle dets metabolitter. Må ikke forveksles med »biotilgængelighed«.

Akkumulering (bioakkumulering): Forøgelse af mængden af et testkemikalie over tid i væv (normalt fedtvæv, efter gentagen eksponering); hvis tilførslen af et testkemikalie til kroppen er større end den hastighed, hvormed det elimineres, akkumulerer organismen testkemikaliet, og der kan opnås toksiske koncentrationer af et testkemikalie.

ADME: akronym for »Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion« (absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse«.

AUC: (område under koncentration-tidskurven for plasma): området under kurven i et diagram over koncentrationen af et testkemikalie i plasma over tid. Det repræsenterer den samlede mængde af testkemikaliet, der absorberes af kroppen i en fastsat periode. Under lineære betingelser er AUC (fra nultid til uendeligt) proportional med den samlede mængde af testkemikaliet, der absorberes af kroppen, uanset absorptionshastighed.

Autoradiografi: (helkropsautoradiografi): bruges til kvalitativt eller kvantitativt at lokalisere et radioaktivt testkemikalie i væv. I denne teknik anvendes røntgenfilm og nu også digital fosfor-imaging til at visualisere radioaktivt mærkede molekyler eller fragmenter af molekyler ved at registrere den stråling, der udsendes fra det undersøgte objekt. Kvantitativ helkropsautoradiografi har visse fordele sammenlignet med organdissekering, hvad angår evaluering af testkemikaliets fordeling og vurderingen af den samlede genfinding og opløsning af radioaktivt materiale i væv. Det er f.eks. en vigtig fordel, at teknikken kan bruges i forbindelse med pigmenterede dyremodeller til at vurdere en mulig sammenhæng mellem testkemikaliet og melanin, som kan binde visse molekyler. Teknikken kan give anvendelige helkropsbilleder af bindingssteder med høj kapacitet/lav affinitet, men den kan være mindre effektiv til at genkende specifikke steder, som f.eks. receptorbindingssteder, hvor detektering kræver relativt høj opløsning og sensitivitet. Når autoradiografi anvendes, gennemføres forsøg med henblik på at bestemme massebalancen af det administrerede stof som en separat gruppe eller i et forsøg, der er adskilt fra forsøget vedrørende fordeling i væv, hvor alle excreta (herunder evt. også udåndet luft) og hele kadavre homogeniseres og analyseres ved hjælp af væskescintillationstælling.

Udskillelse via galde: Udskillelse via galdegangen.

Bioakkumulering: se »Akkumulering«.

Biotilgængelighed: fraktion af den administrerede dosis, der når det systemiske kredsløb eller gøres tilgængeligt på stedet for fysiologisk aktivitet. Normalt henviser biotilgængeligheden af et testkemikalie til moderstoffet, men kan også henvise til dets metabolit. Det vedrører kun én kemisk form. *Bemærk:* Biotilgængelighed og absorption er ikke det samme. Forskellen mellem f.eks. oral absorption (dvs. tilstedeværelse i tarmvæg og portalkredsløb) og biotilgængelighed (dvs. tilstedeværelse i systemisk blod og væv) kan opstå ved kemisk nedbrydning som følge af bl.a. metabolisme i tarmvæg eller transport af efflux tilbage til tarmlumen eller præsystemisk metabolisme i leveren (10). Biotilgængelighed af den toksiske komponent (moderstof eller en metabolit) er en afgørende parameter, når en intern værdi af den eksterne NOAEL eller BMD

▼M4

(anvendt dosis) skal udledes i forbindelse med vurdering af risiko for mennesker (ekstrapolering fra høj til lav dosis eller ekstrapolering mellem administrationsveje). I forbindelse med levervirkninger efter oral administration er oral absorption tilstrækkelig. For alle andre virkninger end ved indgangsstedet er biotilgængelighed generelt en mere pålidelig parameter til brug i risikovurdering end absorption.

Biopersistens: se »Persistens«.

Biotransformation: kemisk (enzym)omdannelse af et undersøgt testkemikalie til et andet kemikalie i kroppen. Synonymt med »metabolisme«.

C_{max}: enten maksimal (spids)koncentration af blod (plasma/serum) efter administration eller maksimal (spids)udskillelse (i urin eller fæces) efter administration.

Clearance-hastighed: kvantitativ måling af den hastighed, hvormed et testkemikalie fjernes fra blod, plasma eller et bestemt væv pr. tidsenhed.

Rum: strukturel eller biokemisk del (eller enhed) af en krop, et væv eller en celle, der er adskilt fra resten.

Afgiftningsveje: serie af trin, der fører til eliminering af toksiske kemikalier i kroppen, enten ved metabolisk ændring eller udskillelse.

Fordeling: spredning af et testkemikalie og dets afledte stoffer i en organisme.

Enzymer/isozymer: proteiner, der katalyserer kemiske reaktioner. Isozymer er enzymer, der katalyserer lignende kemiske reaktioner, men som har en anden aminosyresekvens.

Enzymparametre: K_m: Michaelis-konstant og V_{max}: maksimal velocitet.

Udskillelse: proces(ser), hvorved et administreret testkemikalie og/eller dets metabolitter fjernes fra kroppen.

Eksogent: indført fra eller produceret uden for organismen eller systemet.

Ekstrapolering: følgeslutning af en eller flere ukendte værdier på grundlag af det, der er kendt, eller som er observeret.

Halveringstid ($t_{1/2}$): den tid, der går, inden koncentrationen af testkemikaliet er reduceret til det halve i et rum. Værdien henviser typisk til koncentrationen i plasma eller mængden af testkemikaliet i hele kroppen.

Induktion/enzyminduktion: enzymsyntese som respons på miljøpåvirkende eller inducerende molekyle.

Linearitet/lineær kinetik: En proces, der er lineær med hensyn til kinetik, når alle overførselshastigheder mellem rum er proportionale med de tilstedeværende mængder eller koncentrationer, dvs. første orden. Som følge deraf er clearance- og fordelingsvolumener konstante, og det samme gælder halveringstid. De opnåede koncentrationer er proportionale med doseringshastigheden (eksponering), og akkumulering er mere forudsigelig. Linearitet/ikke-linearitet kan vurderes ved at sammenligne relevante parametre, f.eks. AUC, efter forskellige doser eller efter enkelt og gentagen eksponering. Manglende dosisafhængighed kan indicere mætning af de enzymer, der er involveret i metabolismen af stoffet. En forøgelse af AUC efter gentagen eksponering sammenlignet med enkelt eksponering kan indicere inhibition af metabolisme, og en reduktion i AUC kan indicere induktion af metabolisme [se også (11)].

Massebalance: opgørelse af det testkemikalie, der tilføres og forlader systemet.

Materialebalance: se »Massebalance«.

▼M4

Toksicitetsmekanisme (-måde)/virkningsmekanisme (-måde): virkningsmekanisme er specifikke biokemiske interaktioner, gennem hvilke et testkemikalie producerer sin virkning. Virkningsmåde henviser til mere generelle veje, der fører til et testkemikalies toksicitet.

Metabolisme: synonymt med »biotransformation«.

Metabolitter: produkter af metabolisme eller metaboliske processer.

Oral absorption: den procentdel af dosen af testkemikalie, der absorberes fra administrationsstedet (f.eks. mave-tarmkanalen). Denne kritiske parameter kan bruges til at bestemme den fraktion af det administrerede testkemikalie, der når portalvenen og efterfølgende leveren.

Fordelingskoefficient: kaldes også distributionskoefficienten og er et mål for et kemikalies differentierede opløselighed i to opløsningsmidler.

Peak-niveau i blod (plasma/serum): Maksimal (spids)koncentration i blod (plasma/serum) efter administration (se også »C_{max}«).

Persistens (biopersistens): Langvarig tilstedeværelse af et kemikalie (i et biologisk system) som følge af resistens mod nedbrydning/eliminering.

Analogislutning: information om effektparameter for et eller flere kemikalier bruges til at forudsige effektparameteren for målkemikaliet.

Mikroskopisk autoradiografi af receptor (eller Mikroautoradiografi af receptor): denne teknik kan bruges til at undersøge xenobiotisk interaktion med bestemte vævssteder eller cellepopulationer, f.eks. i forsøg vedrørende receptorbinding eller specifikke virkningsmåder, der kræver høj opløsning og høj sensitivitet, som ikke kan opnås med andre teknikker, som f.eks. helkropsautoradiografi.

Administrationsvej (oral, intravenøs, dermal, inhalation osv.): henviser til den måde, hvorpå kemikalier indgives i kroppen (f.eks. oralt med mavesonde, oralt via foderet, dermalt, ved inhalation, intravenøst osv.).

Mætning: tilstand, hvorved en eller flere af de kinetiske processer (f.eks. absorption, metabolisme eller clearance) er på deres højeste (dvs. »mættede«).

Sensitivitet: en metode eller et instruments evne til at skelne mellem måleresultater, som repræsenterer forskellige niveauer af en undersøgt variabel.

Steady state-niveau i blod (plasma): ikke-ligevægtstilstand for et åbent system, hvor alle kræfter, der påvirker systemet, præcist opvejes af modsatte kræfter på en sådan måde, at alle dets komponenter er stationære i koncentration, selv om stoffet strømmer gennem systemet.

Systemmodellering (fysiologibaseret toksikokinetisk, farmakokinetisk, fysiologibaseret farmakokinetisk, biologisk osv.): abstrakt model, der bruger matematisk sprog til at beskrive systemets funktion.

Målvæv: væv, hvor den primære skadelige virkning af en toksikant manifesteres.

▼**M4**

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Fordeling i væv: reversibel bevægelse af et testkemikalie fra et sted i kroppen til et andet. Fordeling i væv kan undersøges ved hjælp af organdissekering, homogenisering, forbrænding og væskescintillationstælling eller kvalitativ og/eller kvantitativ helkropsautoradiografi. Førstnævnte kan bruges til at fremskaffe oplysninger om koncentration og genfunden procentdel i væv og resten af kadaveret af de samme dyr, men ikke oplysninger om opløsning for alle væv, og kan have en samlet genfinding, der er mindre end ideel (< 90 %). Se definitionen af sidstnævnte ovenfor.

$\mathbf{T_{max}}$: tid til at nå C_{max}.

Toksikokinetik (farmakokinetik): undersøgelse af absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse af kemikalier over tid.

Validering af modeller: proces, hvor det vurderes, om en model er egnet til ensartet at beskrive de tilgængelige toksikokinetiske data. Modeller kan evalueres ved statistisk og visuelt at sammenligne modelforudsigelser med forsøgsværdier i forhold til en fælles uafhængig variabel (f.eks. tid). Omfanget af evaluering begrundes på baggrund af den tiltænkte anvendelse af modellen.

▼B

B.37. **FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER EFTER AKUT EKSPONERING**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtest til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Organiske phosphorforbindelser omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphosthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

Forsinket neurotoksicitet er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. REFERENCESTOFFER

Et referencestof kan testes med en positiv kontrolgruppe som middel til at påvise, at den undersøgte arts reaktion ikke har ændret sig signifikant under laboratorieforsøgsbetingelserne.

Et eksempel på et meget anvendt neurotoksisk stof er tri-o-tolylphosphat (CAS nr. 78-30-8, Einecs nr. 201-103-5, CAS-nomenklatur: phosphorsyre, tris(2-methylphenyl)ester), også kendt som tris-o-cresylphosphat.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet indgives oralt i en enkelt dosis til tamhøner, som om nødvendigt har været beskyttet mod akutte kolinerge effekter. Dyrene observeres i 21 dage for unormal adfærd, ataxi og paralyse. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase, på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter indgift. 21 dage efter eksponering aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

▼B

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Forberedelser**

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.5.2. **Forsøgsbetingelser**

1.5.2.1. *Forsøgsdyr*

Unge, kønsmodne læggehøner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønsene bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.5.2.2. *Antal og køn*

Ud over forsøgsgruppen anvendes både en vehikelkontrolgruppe og en positiv kontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høns kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 21 dage lange observationsperiode med henblik på patologisk undersøgelse.

Den positive kontrolgruppe kan undersøges samtidig eller kan være en nylig historisk kontrolgruppe. Gruppen indeholder mindst seks høner, der behandles med et kendt neurotoksisk stof med forsinket virkning, tre høner til biokemisk undersøgelse og tre høner til patologisk undersøgelse. Regelmæssig ajourføring af historiske data anbefales. Der tilvejebringes nye data om positiv kontrol, hvis det pågældende laboratorium har ændret væsentlige elementer (f.eks. stamme, foder, laboratoriemiljø) i forsøgets gennemførelse.

▼B

1.5.2.3. *Dosisniveauer*

Der gennemføres en forundersøgelse med et passende antal høner og dosisniveaugrupper med henblik på at fastsætte det dosisniveau, der skal anvendes i hovedundersøgelsen. En vis dødelighed er normalt nødvendig i denne forundersøgelse til fastsættelse af en passende dosis til hovedundersøgelsen. For at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter kan imidlertid atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske reaktioner, anvendes. En række forskellige testmetoder kan anvendes til at vurdere den højeste ikke dødelige dosis af teststofferne (se metode B.l.A). Historiske data fra undersøgelser af høner eller andre toksikologiske oplysninger kan også anvendes som støtte ved valg af dosis.

Dosisniveauet for teststoffet i hovedundersøgelsen bør være så højt som muligt under hensyntagen til resultaterne af forundersøgelsen og den øvre dosisgrænse på 2 000 mg/kg legemsvægt. Eventuel dødelighed må ikke forhindre, at et tilstrækkeligt antal dyr overlever med henblik på biokemisk undersøgelse (seks) og histologisk undersøgelse (seks) efter 21 dage. Atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske raktioner, anvendes for at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter.

1.5.2.4. *Grænsetest*

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksisk virkning på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.5.2.5. *Observationsperiode*

Observationsperioden varer 21 dage.

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Efter indgift af et beskyttende middel til forhindring af dødsfald som følge af akut kolinerg effekt indgives teststoffet i en enkelt dosis.

1.5.3.1. Generelle observationer

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt flere gange i løbet af de første to dage og derefter mindst en gang dagligt i en periode på 21 dage eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt, Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages de høner, der er udvalgt til patologisk undersøgelse, af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

▼B

1.5.3.2. Legemsvægt

Alle hønerne vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.5.3.3. Biokemisk undersøgelse

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe og tre høner fra den positive kontrolgruppe (hvis denne guppe undersøges samtidig) aflives inden for få dage efter indgift, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre haner fra vehikelkontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe efter 24 timer og tre efter 48 timer, mens de tre høner fra den positive kontrolgruppe aflives efter 24 timer. Hvis observation af kliniske tegn på forgiftning (dette kan ofte vurderes ved observation af tidspunktet for indtræden af kolinerge symptomer) indicerer, at det toksiske stof udskiltes meget langsomt, kan det være bedre at udtage væv fra tre høner på hvert af to andre tidspunkter mellem 24 timer og 72 timer efter administration.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

1.5.3.4. Makroskopisk undersøgelse

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af udseende af hjerne og rygmarv.

1.5.3.5. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen), medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og af ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver.

2. **DATA**

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet. Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

▼B

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden af og korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøget begyndelse.

Forsøgsbetingelser

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— oplysninger om eventuelle beskyttelsesmidler og om indgift heraf.

Resultater:

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. gruppe, herunder dødelighed

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 418 fra OECD.

▼B

B.38. **FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER GENTAGEN DOSIS — 28 DAGE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtest til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Denne 28 dages test for forsinket neurotoksicitet giver oplysninger om mulige sundhedsrisici som følge af gentagen eksponering i et begrænset tidsrum. Testen giver oplysninger om dosis/respons og kan danne grundlag for en vurdering af et nul-effekt-niveau (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for eksponering.

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Organiske phosphorforbindelser omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphorthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forsårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

Forsinket neurotoksicitet er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Daglige doser af teststoffet indgives oralt til høner i 28 dage. Dyrene observeres mindst en gang dagligt for unormal adfærd, ataxi og paralyse indtil 14 dage efter sidste dosis. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase (NTE), på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter sidste dosis. To uger efter sidste dosis aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelser**

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.4.2. **Forsøgsbetingelser**

1.4.2.1. *Forsøgsdyr*

Unge, kønsmodne høner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønerne bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.4.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes generelt mindst tre forsøgsgrupper og en vehikelkontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høner kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 14 dage lange observationsperiode efter eksponering med henblik på patologisk undersøgelse.

1.4.2.3. *Dosisniveauer*

Dosisniveauerne vælges under hensyntagen til resultaterne af en test for forsinket neurotoksicitet efter akut eksponering og eventuelle andre foreliggende data vedrørende teststoffets toksicitet eller kinetik. Det højeste dosisniveau vælges med henblik på at inducere toksiske virkninger, om muligt forsinket neurotoksicitet, men ikke død eller tydelig lidelse. Herefter vælges en række dosisniveauer i faldende størrelse til påvisning af dosisrelaterede reaktioner og fravær af erkendbare virkninger (NOAEL) ved det laveste dosisniveau.

▼B

1.4.2.4. *Grænsetest*

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksiske virkninger på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.4.2.5. *Observationsperiode*

Dyrene observeres mindst en gang dagligt i eksponeringsperioden og 14 dage efter, medmindre de skal obduceres.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene indgives teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage.

1.4.3.1. *Generelle observationer*

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt mindst en gang daglig i de 28 dage og i 14 dage efter eksponering, eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Observationerne omfatter, men er ikke begrænset til, unormal adfærd. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages hønerne af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

1.4.3.2. *Legemsvægt*

Alle hønsene vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.4.3.3. *Biokemisk undersøgelse*

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe aflives få dage efter indgift af sidste dosis, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase, Derudover kan det være nyttigt at præparere og undersøge ischiasnervevæv for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre høner fra kontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe 24 timer og tre 48 timer efter sidste dosis. Hvis data fra undersøgelsen for akut toksicitet eller andre undersøgelser (f.eks. toksikokinetik) indicerer, at andre tidspunkter for aflivning efter sidste dosis er bedre end de her nævnte, anvendes disse med angivelse af begrundelsen herfor.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

▼B

1.4.3.4. *Makroskopisk undersøgelse*

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af hjerne og rygmarv.

1.4.3.5. *Histopatologisk undersøgelse*

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen) medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver. Først foretages der en mikroskopisk undersøgelse af præserveret væv fra alle dyrene i kontrolgruppen og højdosisgruppen. Hvis der er tegn på virkninger i højdosisgruppen, foretages der også en mikroskopisk undersøgelse af høner fra mellem- og lavdosisgrupperne.

2. **DATA**

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden og af korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøgets begyndelse.

▼B

Forsøgsbetingelser:

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— begrundelse for valg af andre tidspunkter for biokemisk bestemmelse end efter 24 og 48 timer.

Resultater

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. dosisniveau, herunder dødelighed

— nul-effekt-niveau (NOAEL)

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 419 fra OECD.

▼B

B.39. TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTESE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1. INDLEDNING

Formalet med testen for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo er at påvise, om et teststof inducerer dna-reparation i levercellerne hos de behandlede dyr (1) (2) (3) (4).

Denne in vivo-test indeholder en metode til undersøgelse af kemikaliers gentoksiske virkninger i leveren. Det målte endpoint er tegn på dna-beskadigelse og deraf følgende reparation i leverceller. Leveren er normalt det sted, hvor absorberede stoffer først og fremmest metaboliseres. Den er derfor et egnet sted til in vivo-måling af dna-beskadigelse.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Endpoint for unscheduled DNA-syntese (UDS) måles ved at bestemme optagelsen af mærkede nukleosider i celler, hvor der ikke foregår planmæssig dna-syntese (S-fase). Den mest benyttede teknik består i at bestemme optagelsen af tritiummærket thymidin (^{3}H-TdR) ved autoradiografi. Der bør fortrinsvis benyttes rottelevere i UDS-test in vivo. Der kan benyttes andet væv end levervæv, men det er ikke omfattet af denne metode.

Påvisningen af et UDS-respons afhænger af, hvor mange dna-baser der er skåret ud og erstattet på det beskadigede sted. Derfor er UDS-testen særlig værdifuld til påvisning af stoffremkaldt »long-patch repair« (20-30 baser). Til gengæld er følsomheden over for »shortpatch repair« (1-3 baser) meget lavere. Endvidere kan der optræde mutagene hændelser som følge af manglende reparation, forkert reparation eller forkert replikation af dna-skader. UDS-metodens reaktion er ikke noget mål for, i hvor høj grad reparationsprocessen er lykkedes. Ydermere er det muligt, at et mutagen reagerer med dna, men at dna-beskadigelsen ikke repareres ved en udskæringsreparationsproces. De beskedne specifikke oplysninger om mutagen aktivitet, som UDS-testen giver, opvejes af, at dens endpoint potentielt har høj følsomhed, eftersom det måles i hele genomet.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Celler under reparation: et NNG-tal, der er højere end en forud fastsat værdi, som det laboratorium, der udfører testen, skal begrunde.

Nettokernekorn (NNG): kvantitativt mål for cellers UDS-aktivitet ved en autoradiografisk UDS-test; tallet beregnes ved at trække gennemsnitsantallet af cytoplastmakorn i kerneækvivalente områder af cytoplasmaet (CG) fra antallet af kernekorn (NG), dvs. NNG = NG-CG. NNG-tallet beregnes for den enkelte celle, hvorefter tallene samles i puljer for celler i samme kultur, for parallelle kulturer osv.

▼B

Unscheduled DNA-syntese (UDS): dna-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en dna-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testen med pattedyrleverceller in vivo viser dna-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en dna-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger. Testen baseres sædvanligvis på indsætning af ^{3}H-TdR i dna'et i leverceller, hvor der er lav forekomst af celler i cellecyklussens S-fase. Optagelse af ^{3}H-TdR bestemmes normalt ved autoradiografi, eftersom denne teknik, i modsætning til f.eks. væskescintillation, ikke er følsom over for interferens fra celler i S-fase.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til del B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

1.4.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I hver individuelt gennemført del af forsøget medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolstoffer bør være stoffer, der vides at fremkalde UDS, når de indgives i en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Positive kontrolstoffer, der kræver metabolismeaktivering, bør benyttes i doser, der frembringer moderat reaktion (4). Doserne kan vælges på en sådan måde, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Prøveudtagningstidspunkt	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Tidlig prøveudtagning (2-4 timer)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sen prøveudtagning	N-2-fluorenylacetamid	53-96-3	200-188-6

Der kan anvendes andre egnede positive kontrolstoffer. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Der anvendes tilstrækkelig mange dyr til, at der er taget hensyn til den naturlige variation i reaktionerne på testen. Der skal være mindst tre analyserbare dyr i hver gruppe. Er der indsamlet en betydelig historisk database, kræves der kun et eller to dyr i sideløbende negative og positive kontrolgrupper.

Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun et køn, helst hanner, tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives normalt i en enkelt behandling.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Normalt benyttes der to dosisniveauer. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Normalt bør laveste dosis være mellem 50 % og 25 % af den højeste dosis.

▼B

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen.

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i leveren (f.eks. pyknotiske kerner).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, er en fuldstændig undersøgelse muligvis ikke nødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da leveren derved kan udsættes for teststoffet direkte og ikke via kredsløbet. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. **Præparering af leverceller**

Leverceller fra behandlede dyr præpareres normalt 12-16 timer efter indgiften. Medmindre reaktionen på dette tidspunkt er tydeligt positiv, er desuden yderligere en tidlig prøveudtagning (normalt to-fire timer efter indgiften) sædvanligvis påkrævet. Andre tidspunkter for prøveudtagning kan benyttes, når de kan begrundes med toksikokinetiske data.

Korttidskulturer af pattedyrleverceller etableres sædvanligvis ved perfusion af leveren in situ med collagenase, idet man lader frisk dissocierede leverceller sætte sig fast på en egnet flade. Leverceller fra negative kontroldyr skal have en levedygtighed (5) på mindst 50 %.

1.5.7. **Bestemmelse af UDS**

Nyligt isolerede pattedyrleverceller inkuberes normalt i et medium, der indeholder ^{3}H-TdR i et passende tidsrum, f.eks. tre-otte timer. Når inkubationstiden er afsluttet, fjernes mediet fra cellerne, som dernæst kan inkuberes i et medium, der indeholder overskud af umærket thymidin, så ikke-indbygget radioaktivitet (»cold chase«) bliver mindst mulig. Cellerne skylles, fikseres og tørres. Ved længere inkuberingstider er »cold chase« ikke altid nødvendigt. Objektglassene dyppes i autoradiografiemulsion, eksponeres i mørke (f.eks. i køleskab i 7-14 dage), fremkaldes og farves, og de eksponerede sølvkorn tælles. Der fremstilles to-tre objektglas pr. dyr.

▼B

1.5.8. **Analyse**

De præparede objektglas skal indeholde tilstrækkelig mange celler med normal morfologi til, at der kan foretages en meningsfyldt vurdering af UDS. Præparaterne undersøges mikroskopisk for tegn på åbenlys cytotoksicitet (f.eks. pyknose eller nedsat radioaktiv mærkning).

Objektglassene kodes, inden kornene tælles. Normalt bedømmes der 100 celler fra hvert dyr på mindst to objektglas; bedømmelse af mindre end 100 celler pr. dyr skal begrundes. Der tælles ikke korn for celler i S-fase, men andelen af celler i S-fase kan registreres.

Den mængde ^{3}H-TdR, der indbygges i kerner og cytoplasma i morfologisk normale celler, og som giver sig udtryk i afsættelse af sølvkorn, bestemmes med egnede metoder.

Der foretages korntælling over kernerne (kernekorn, NG) og kerneækvivalente områder over cytoplasmaet (cytoplasmakorn, CG). CG-tallene fremkommer enten ved at tage de kraftigst mærkede cytoplasmaområder eller ved at tage gennemsnittet af to-tre tilfældigt foretagne tællinger af cytoplasmakorn i nærheden af kernerne. Der kan benyttes andre tællemetoder (f.eks. helcelletælling), hvis de kan begrundes (6).

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene præsenteres for hvert enkelt objektglas og hvert enkelt dyr. Desuden sammenfattes alle data i tabel form. For hver celle, hvert dyr og hver dosis og tidspunkt beregnes tallet for nettokernekorn (NNG) ved at trække CG-tallene fra NG-tallene. Hvis der tælles »celler under reparation«, skal de kriterier, der benyttes til definering af »celler under reparation«, begrundes og underbygges med tidligere og sideløbende negative kontroldata. Talresultater kan evalueres ved statistiske metoder. Eventuelt benyttede statistiske test skal vælges og begrundes, inden undersøgelsen gennemføres.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Nedenfor følger nogle eksempler på kriterier for positiv/negativ reaktion:

positiv
(i) NNG-værdier, der er højere end en forud fastsat tærskelsværdi, som er begrundet med udgangspunkt i laboratoriets tidligere data eller

(ii) NNG-værdier, der er signifikant større end sideløbende kontrol

negativ
(i) NNG-værdier, der er inden for eller under en kontroltærskelværdi, der bygger på tidligere resultater eller

(ii) NNG-værdier, der ikke er signifikant større end sideløbende kontrol

▼B

Dataenes biologiske relevans skal tages i betragtning, f.eks. sådanne parametre som variation mellem dyr, sammenhæng mellem dosis og respons og cytotoksicitet. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bor ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en test for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo viser, at teststoffet inducerer dna-skader i pattedyrleverceller in vivo, som kan repareres ved unscheduled DNA-syntese in vivo. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke inducerer dna-skader, der kan påvises ved denne test.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr og deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

▼B

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr, dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— metoder til præparering og dyrkning af leverceller

— anvendt autoradiografiteknik

— antal præparerede objektglas og antal bedømte celler

— evalueringskriterier

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— gennemsnitsværdier af kernekorn, cytoplasmakorn og nettokernekorn for hvert enkelt objektglas, dyr og gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— tegn på toksicitet

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— antal »celler under reparation«, hvis det er bestemt

— antal celler i S-fase, hvis det er bestemt

— cellernes levedygtighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, H., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In* Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 12-133.

(3) Kennelly, J.C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D.J. and Fox, M., (eds.), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo,* Mutations Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In*Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.L. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In* Vivo/ln Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553-562.

▼M8

B.40. **IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE TIL MÅLING AF TRANSKUTAN ELEKTRISK MODSTAND (TER)**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 430 (2015). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1])]. Den opdaterede forsøgsmetode B.40 indeholder en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i overensstemmelse med UN GHS (1) og CLP.

2. Vurderingen af hudætsning har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (2). Ud over nærværende TM B.40 er der blevet valideret og vedtaget andre in vitro-forsøgsmetoder til testning af kemikaliers hudætsningspotentiale som TM B.40.A (der svarer til OECD TG 431) (3) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (4), der også er i stand til at identificere underkategorier af ætsende kemikalier, når dette er nødvendigt. Der er blevet vedtaget flere validerede in vitro-forsøgsmetoder som TM B.46 (der svarer til OECD TG 439) (5), som kan anvendes til testning af hudirritation. Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (6).

3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudætsning. Den er baseret på forsøgsmetoden til måling af den transkutane elektriske modstand (TER) i rottehud, hvor der anvendes hudlapper til identificering af ætsende stoffer ved deres evne til at beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion. Den tilsvarende OECD-testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2004 og opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument.

4. For at evaluere in vitro-testning af hudætsning i lovgivningsøjemed blev der gennemført prævalideringsundersøgelser (7) efterfulgt af en formel valideringsundersøgelse af TER-forsøgsmetoden med rottehud til vurdering af hudætsning (8) (9) (10) (11). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

▼**M8**

blev det henstillet, at TER-forsøgsmetoden (betegnet som den validerede referencemetode – VRM) blev anvendt til vurdering af in vivo-hudætsning i lovgivningsøjemed (12) (13) (14).

5. Inden der kan anvendes en foreslået lignende eller ændret in vitro-TER-forsøgsmetode end VRM'en til vurdering af hudætsning i lovgivningsøjemed, skal dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og grænserne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'en, i overensstemmelse med kravene om ydeevnestandarder (15). OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret forsøgsmetode i henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den tilsvarende OECD-testvejledning.

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. I henhold til en valideringsundersøgelse (10) og andre offentliggjorte undersøgelser (16) (17) kan forsøgsmetoden vedrørende måling af TER i rottehud skelne mellem stoffer, der er hudætsende, og stoffer, der ikke er hudætsende, med en overordnet følsomhed på 94 % (51/54) og specificitet på 71 % (48/68) for en database med 122 stoffer.

8. Denne forsøgsmetode vedrører in vitro-test af hudætsning. Den gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende testkemikalier i henhold til UN GHS/CLP. Som det fremgår af valideringsundersøgelserne (8) (9) (10) (11), er denne forsøgsmetode begrænset derved, at den ikke gør det muligt at inddele de ætsende stoffer og blandinger i underkategorier i henhold til UN GHS/CLP. Den gældende lovramme afgør, hvordan denne forsøgsmetode anvendes. Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 specifikt vedrører in vitro-test af hudirritation (5). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om IATA følges (6).

9. Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier, som primært repræsenterer stoffer, i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og den empiriske database for valideringsundersøgelsen omfatter 60 kemikalier i alt, som dækker en lang række kemiske grupper (8) (9). På baggrund af alle tilgængelige data kan forsøgsmetoden anvendes på en lang række kemiske grupper og fysiske tilstande, herunder væsker, halvfaste stoffer, faste stoffer og voks. Da det ikke altid er muligt at få fat i testemner med egnede referencedata i specifikke fysiske tilstande, skal det bemærkes, at et forholdsvis lille antal vokser og ætsende stoffer i fast form er blevet vurderet under valideringen. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er egnet til en specifik kategori af stoffer, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af stoffer. Eftersom forsøgsmetoden kan anvendes på stoffer, forventes den desuden at kunne anvendes på blandinger. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som fremsat af Eskes et al., 2012) (18), ikke anvendes til forsøg med denne

▼M8

specifikke kategori af blandinger. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (8) (9). Selv om det er tænkeligt, at disse kan testes ved hjælp af TER-forsøgsmetoden, muliggør den nuværende forsøgsmetode ikke test af gasser og aerosoler.

PRINCIP FOR TESTEN

10. Testkemikaliet påføres i op til 24 timer på den epidermale overflade af hudlapper i et testsystem med to rum, hvor hudlapperne fungerer som adskillelse mellem de to rum. Hudlapperne tages fra 28-30 dage gamle rotter, der er aflivet på en human måde. Ætsende kemikalier identificeres ved deres evne til at beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som et fald i den naturlige TER under en tærskelværdi (16) (jf. punkt 32). For TER i rottehud er der valgt en tærskelværdi på 5 kΩ på baggrund af omfattende data om en lang række stoffer, hvor langt de fleste værdier var enten langt over (ofte > 10 kΩ) eller langt under (ofte < 3 kΩ) denne værdi (16). Testkemikalier, som ikke er ætsende hos dyr, men som er irriterende eller ikke-irriterende, medfører generelt ikke en TER under denne tærskelværdi. Brugen af andre hudpræparater eller andet udstyr kan endvidere ændre tærskelværdien og nødvendiggøre yderligere validering.

11. Testproceduren omfatter et farvebindingstrin til bekræftende testning af positive resultater i TER-metoden, herunder værdier omkring 5 kΩ. Farvebindingstrinnet viser, om stigningen i gennemtrængeligheden for ioner skyldes fysisk ødelæggelse af stratum corneum. TER-metoden med rottehud har vist sig at kunne forudsige in vivo-ætsningen hos kaniner vurderet i henhold til TM B.4 (2).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

12. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af TER-forsøgsmetoden med rottehud, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt klassificering af de 12 anbefalede kompetencestoffer i tabel 1. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (16)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 1

Liste over kompetencestoffer ([1])

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ([2])	UN GHS-/CLP-kat. baseret på in vivo-resultater ([3])	VRM-kat. baseret på in vitro-resultater	Fysisk tilstand	pH ([4])
In vivo– ætsende stoffer						
N,N'-dimethyl dipropylentriamin	10563-29-8	organisk base	1A	6 × C	Flyd.	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organisk base	1A	6 × C	Flyd.	8,3

▼**M8**

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ([2])	UN GHS-/CLP-kat. baseret på in vivo-resultater ([3])	VRM-kat. baseret på in vitro-resultater	Fysisk tilstand	pH ([4])
In vivo– ætsende stoffer						
Svovlsyre (10 %)	7664-93-9	uorganisk syre	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	Flyd.	1,2
Kaliumhydroxid (10 % aq.)	1310-58-3	uorganisk base	(1A/)1B/1C	6 × C	Flyd.	13,2
Octansyre (kaprylsyre)	124-07-2	organisk syre	1B/1C	4 × C 2 × NC	Flyd.	3,6
2-tert-butylphenol	88-18-6	phenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	Flyd.	3,9
In vivo – ikke-ætsende stoffer						
Isostearinsyre	2724-58-5	organisk syre	NC	6 × NC	Flyd.	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organisk base	NC	6 × NC	Fast	5,5
Phenethylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NC	Flyd.	3,6
4-(methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 × NC	Flyd.	6,8
1,9-decadien	1647-16-1	neutralt organisk	NC	6 × NC	Flyd.	3,9
Tetrachlorethylen	127-18-4	neutralt organisk	NC	6 × NC	Flyd.	4,5

Forkortelser: aq. = vandig; CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service VRM = valideret referencemetode; C = ætsende; NC = ikke-ætsende.

([1]) Kompetencestofferne, der først er sorteret efter deres ætsende versus ikke-ætsende egenskaber, dernæst efter deres underkategori for ætsende stoffer og endelig efter deres kemiske gruppe, er udvalgt blandt de stoffer, der blev anvendt i ECVAM-valideringsundersøgelsen af TER-forsøgsmetoden med rottehud (8) (9). Medmindre andet er angivet, er stofferne testet ved det renhedsniveau, de havde, da de blev købt (8). De udvalgte stoffer omfatter så vidt muligt stoffer, der: i) er repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, svagt til kraftigt ætsende), som VRM'en er i stand til at måle eller forudsige, ii) er repræsentative for de kemiske grupper, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen, iii) afspejler ydeevnekarakteristikaene for VRM'en, iv) har veldefinerede kemiske strukturer, v) giver definitive resultater i in vivo-referenceforsøgsmetoden, vi) findes i handelen og vii) ikke er forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

([2]) Kemisk gruppe, jf. Barratt et al. (8).

([3]) De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS-/CLP-kategori 1A, 1B og 1C.

([4]) pH-værdierne stammer fra Fentem et al. (9) og Barratt et al. (8).

▼M8

FREMGANGSMÅDE

13. Der findes standardprocedurer (SOP'er) for TER-forsøgsmetoden til testning for hudætsning med rottehud (19). De TER-forsøgsmetoder med rottehud, der er omfattet af denne forsøgsmetode, bør overholde følgende betingelser:

Dyr

14. Der bør anvendes rotter, fordi deres huds følsomhed over for stoffer med denne forsøgsmetode tidligere er påvist (12), og fordi de er den eneste kilde til hud, der er formelt valideret (8) (9). Rottens alder (når hudprøven tages) og stamme er særligt vigtig for at sikre, at hårfolliklerne er i hvile, inden væksten af voksenhår begynder.

15. Hårene på ryggen og flanken af unge (ca. 22 dage gamle) han- eller hunrotter (af Wistar-stammen eller lignende stamme) fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet der gnubbes let, og det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika, som f.eks. indeholder streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer, der er høje nok til at inhibere bakterievækst. Dyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- eller fjerdedagen efter den første vask og skal anvendes senest tre dage efter den anden vask, når stratum corneum har regenereret sig efter fjernelsen af hår.

Fremstilling af hudlapper

16. Dyrene aflives på human måde, når de er 28-30 dage gamle. Alderen er kritisk. Ryghuden fjernes fra hvert dyr, og overflødigt fedtvæv fjernes omhyggeligt, idet det skrælles af huden. Hudlapper med en diameter på ca. 20 mm udtages. Huden kan gemmes, indtil lapperne skal anvendes, hvis det er påvist, at positive og negative kontroldata svarer til de data, der opnås med frisk hud.

17. Hver hudlap anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet det sikres, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En O-ring af gummi sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødigt væv klippes af. O-ringen af gummi forsegles derefter omhyggeligt til enden af PTFE-røret med vaseline. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et receptorkammer, som indeholder en $MgSO_4$-opløsning (154 mM) (figur 1). Hudlappen skal være fuldstændigt dækket af $MgSO_4$-opløsningen. Der kan fremstilles op til 10-15 hudlapper af huden fra en enkelt rotte. Rørets og O-ringens dimensioner fremgår af figur 2.

18. Inden testen indledes, måles TER i to hudlapper for at kontrollere den enkelte dyrehuds kvalitet. For begge hudlapper skal den elektriske modstand være større end 10 kΩ, hvis resten af lapperne skal kunne anvendes i forsøgsmetoden. Hvis modstanden er mindre end 10 kΩ, kasseres resten af lapperne fra den pågældende hud.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

19. Der bør anvendes sideløbende positive og negative kontroller i hver analyseserie (hvert forsøg) for at sikre, at forsøgsmodellen fungerer korrekt. Der skal anvendes hudlapper fra et enkelt dyr i hver analyseserie (hvert forsøg). Som testkemikalier til de positive og negative kontroller foreslås henholdsvis 10 M saltsyre og destilleret vand.

▼M8

20. Flydende testkemikalier (150 µl) påføres på den epidermale overflade inde i røret. Ved faste teststoffer skal en tilstrækkelig mængde stof påføres hudlappen, så hele epidermisoverfladen er dækket af stoffet. Der tilsættes deioniseret vand (150 µl) oven på det faste stof, og røret rystes forsigtigt. For at sikre maksimal kontakt med huden kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter eller blødgøres, eller formale dem til granulat eller pulver.

21. Der bruges tre hudlapper til hvert test- og kontrolkemikalie i hver analyseserie (hvert forsøg). Testkemikalierne skal sidde på huden i 24 timer ved 20-23 °C. Testkemikaliet fjernes under rindende ledningsvand, der højst må have stuetemperatur, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet.

TER-målinger

22. Hudens impedans måles som TER ved hjælp af en wheatstone-lavvoltvekselstrømsmålebro (18). De generelle specifikationer for broen er en driftsspænding på 1-3 V, en sinusformet eller rektangulært formet vekselstrøm på 50-1 000 Hz og et måleområde på mindst 0,1-30 kΩ. Den målebro, der anvendes i valideringsundersøgelsen, målte induktans, kapacitet og modstand op til værdier på henholdsvis 2 000 H, 2 000 µF og 2 MΩ ved frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz ved hjælp af serieværdier eller parallelle værdier. I forbindelse med TER-ætsningsassayet registreres målingerne af modstand ved en frekvens på 100 Hz og ved hjælp af serieværdier. Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70 % ethanol i så tilstrækkelig mængde, at hele epidermis dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanolen fra røret, og vævet fugtes ved tilsætning af 3 ml $MgSO_4$-opløsning (154 mM). Elektroderne fra målebroen anbringes på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i kΩ/hudlap (figur 1). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 2. Krokodillenæbbet på den indre elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under modstandsmålingen, hvorved det sikres, at et konstant stykke af elektroden er nede i $MgSO_4$-opløsningen. Den ydre elektrode er anbragt inde i receptorkammeret, så den rører ved kammerbunden. Afstanden mellem fjederklemmen og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant (figur 2), da den har indflydelse på den målte modstand. Det betyder, at afstanden mellem den indre elektrode og hudlappen skal være konstant og så lille som mulig (1-2 mm).

23. Hvis den målte modstand er større end 20 kΩ, kan det skyldes, at rester af testkemikaliet ligger som en belægning på hudlappens epidermale overflade. Man kan forsøge at fjerne denne belægning ved at holde en tommelfinger iført en gummitut for PTFE-røret og ryste røret i ca. 10 sekunder. Derefter kasseres $MgSO_4$-opløsningen, og målingen gentages med en ny $MgSO_4$-opløsning.

24. Testapparaturets egenskaber og dimensioner og den anvendte forsøgsprocedure kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 kΩ, blev bestemt med det apparatur og den procedure, der er beskrevet i denne forsøgsmetode. Hvis testbetingelserne ændres, eller der anvendes andet apparatur, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdierne for modstand kalibreres ved at teste en række kompetencestoffer, der vælges blandt de stoffer, som blev anvendt i valideringsundersøgelsen (8) (9), eller blandt kemiske grupper, der svarer til de undersøgte stoffer. Tabel 1 viser et sæt relevante kompetencestoffer.

▼M8

Farvebindingsmetoder

25. Eksponering for visse ikke-ætsende stoffer kan bevirke, at modstanden falder til under tærskelværdien på 5 kΩ, hvorved ioner kan passere gennem stratum corneum, hvilket sænker den elektriske modstand (9). Neutrale organiske stoffer og stoffer med overfladeaktive egenskaber (herunder rengøringsmidler, emulgatorer og andre overfladeaktive stoffer) kan fjerne hudfedt og gøre barrieren gennemtrængelig for ioner. Hvis TER-værdierne for disse kemikalier er mindre end eller omkring 5 kΩ, og der ikke forekommer synlige ødelæggelser af hudlapperne, skal farvestoffets evne til at trænge ned i kontrolvævet og det behandlede væv vurderes med henblik på at afgøre, om de opnåede TER-værdier skyldes øget hudgennemtrængelighed eller hudætsning (7) (9). I sidstnævnte tilfælde, hvor stratum corneum er ødelagt, trænger farvestoffet sulforhodamin B efter påføring på hudoverfladen hurtigt ned og farver det underliggende væv. Netop dette farvestof er stabilt i forbindelse med en lang række stoffer og påvirkes ikke af den ekstraktionsprocedure, der er beskrevet i det følgende.

Påføring og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B

26. Efter TER-undersøgelsen fjernes magnesiumsulphatopløsningen fra røret, og huden undersøges omhyggeligt for synlige ødelæggelser. Hvis ikke der forekommer større synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), påføres 150 µl af en 10 % (w/v)-opløsning af sulforhodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-nummer 3520-42-1) i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i to timer. Disse hudlapper vaskes derefter i ca. 10 sekunder med ledningsvand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundetfarvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glasset rystes forsigtigt i fem minutter for at fjerne yderligere ikke-bundet farvestof. Denne skylning gentages, hvorefter hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30 % (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulphat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60 °C til næste dag.

27. Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i otte minutter ved 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175 × g). 1 ml af supernatanten fortyndes 5 gange (v/v) [dvs. 1 ml + 4 ml] med en 30 % (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens optiske tæthed (OD) måles ved 565 nm.

Beregning af farveindhold

28. Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (9) (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$; molekylvægten = 580). Farveindholdet bestemmes for hver hudlap ved hjælp af en passende kalibreringskurve, hvorefter et gennemsnitligt farveindhold beregnes for replikaterne.

Acceptkriterier

29. De gennemsnitlige TER-resultater godkendes, hvis værdierne for de sideløbende positive og negative kontroller falder inden for de acceptable intervaller for metoden i testlaboratoriet. De acceptable modstandsintervaller for den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i nedenstående tabel:

▼**M8**

Kontrol	Stof	Modstandsinterval (kΩ)
Positiv	10 M saltsyre	0,5-1,0
Negativ	Destilleret vand	10-25

30. De gennemsnitlige resultater for farvebinding godkendes, hvis værdierne for de sideløbende kontroller falder inden for de acceptable intervaller for metoden. De foreslåede acceptable intervaller for farveindhold for de kontrolstoffer, den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i nedenstående tabel:

Kontrol	Stof	Interval af farveindhold (µg/hudlap)
Positiv	10 M saltsyre	40-100
Negativ	Destilleret vand	15-35

Fortolkning af resultater

31. Den TER-tærskelværdi, hvorved der skelnes mellem ætsende og ikke-ætsende testkemikalier, blev opstillet under forsøgsmetodeoptimeringen, testet forud for validering og bekræftet i en formel valideringsundersøgelse.

32. Forudsigelsesmodellen for TER-forsøgsmetoden til testning for hudætsning med rottehud (9) (19), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises nedenfor:

Testkemikaliet betragtes ikke som værende hudætsende:

i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er større end (>) 5 kΩ, eller

ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med (≤) 5 kΩ, og

— hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), og

— det gennemsnitlige farveindhold er mindre end (>) det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10 M HCl (jf. punkt 30 vedrørende positive kontrolværdier).

Testkemikaliet betragtes som værende hudætsende:

i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med (≤) 5 kΩ, og hudlappen er synligt beskadiget (f.eks. perforation), eller

ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for testkemikaliet er mindre end eller lig med (≤) 5 kΩ, og

— hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse (f.eks. perforation), men

▼M8

— det gennemsnitlige farveindhold er større end eller lig med (≥) det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10 M HCl (jf. punkt 30 vedrørende positive kontrolværdier).

33. En analyseserie (et forsøg) bestående af mindst tre hudlapsreplikater bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringen er entydig. I tilfælde af tvetydige resultater, såsom diskordante replikatmålinger og/eller en gennemsnitlig TER på 5 ± 0,5 kΩ, bør det overvejes at gennemføre en anden uafhængig analyseserie (et andet forsøg) samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier (forsøg) er diskordante.

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. De målte resultater for modstand (kΩ) og eventuelt farveindhold (µg/hudlap) i testkemikaliet og i positive og negative kontroller bør fremlægges i tabelform, herunder også data fra de enkelte hudlapsreplikater i hver analyseserie (hvert forsøg) og gennemsnitsværdier ± standardafvigelser. Alle gentagne forsøg bør rapporteres. Iagttagne ødelæggelser af hudlapperne bør rapporteres for hvert testkemikalie.

Testrapport

35. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer:

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— oprindelse, evt. batchnummer

— behandling af testkemikaliet/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt

— opbevaringsforhold.

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme og køn

— alder på dyr anvendt som donordyr

— oprindelse, miljøbetingelser, foder osv.

— oplysninger om fremstillingen af hudlapper.

▼**M8**

Testbetingelser:

— kalibreringskurver for testapparatur

— kalibreringskurver for farvebindingstestens ydeevne, båndpas anvendt til måling af OD-værdier og måleudstyrets OD-lineraritetsinterval (f.eks. spektrofotometer), hvis relevant

— detaljer om den testprocedure, der blev anvendt til TER-målinger

— detaljer om den testprocedure, der eventuelt blev anvendt til måling af farvebinding

— anvendte testdoser, eksponeringsperiodens/-periodernes varighed og eksponeringstemperatur(er)

— detaljer om den vaskeprocedure, der blev anvendt efter eksponeringsperioden

— antal anvendte hudlapsreplikater pr. testkemikalie og kontrol (positiv og negativ kontrol)

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysninger om:

  i) hvorvidt positive og negative TER-kontrolværdier (i kΩ) kan accepteres, sammenlignet med modstandsintervaller for positive og negative kontroller

  ii) hvorvidt positive og negative farveindholdskontrolværdier (i µg/hudlap) kan accepteres, sammenlignet med farveindholdsintervaller for positive og negative kontroller

  iii) hvorvidt testresultaterne kan accepteres, sammenlignet med den historiske variabilitet mellem hudlapsreplikater

— beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel.

Resultater:

— angivelse i tabelform af data fra TER- og eventuelt farvebindingsassay for hvert enkelt testkemikalie og hver enkelt kontrol, for hver analyseserie (hvert forsøg) og hvert hudlapsreplikat (de enkelte dyr og hudlapper), gennemsnit, standardafvigelser og variationskoefficienter

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.

(3) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudmodel.

(4) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.

(5) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., og Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., og Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., og Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483-524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., og Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., og Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., og Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

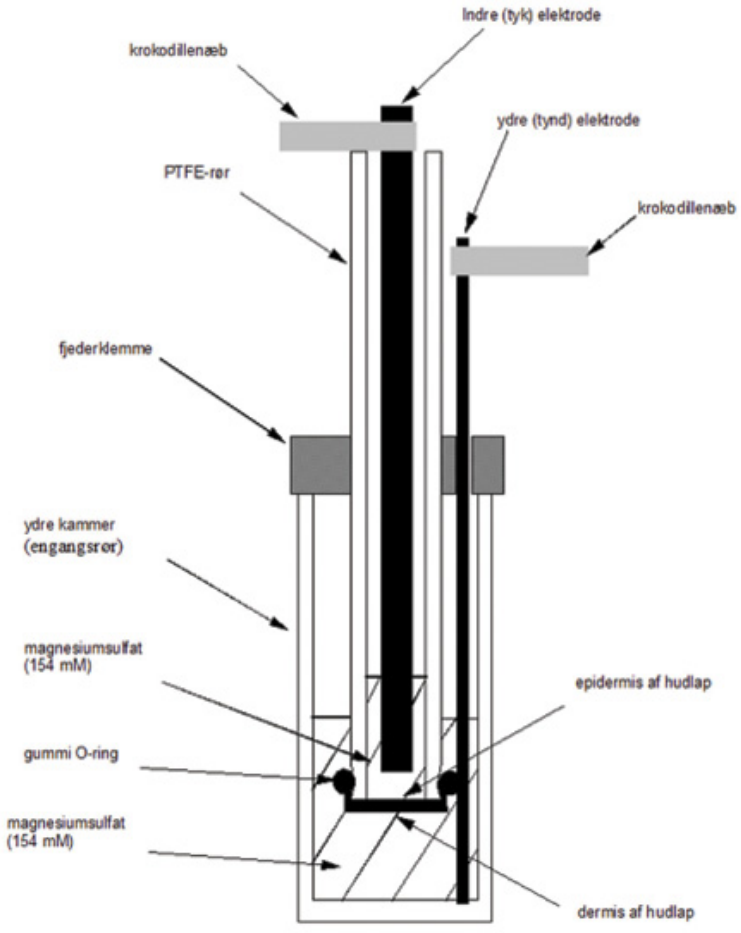
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. og Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul. *Toxicol. Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Figur 1

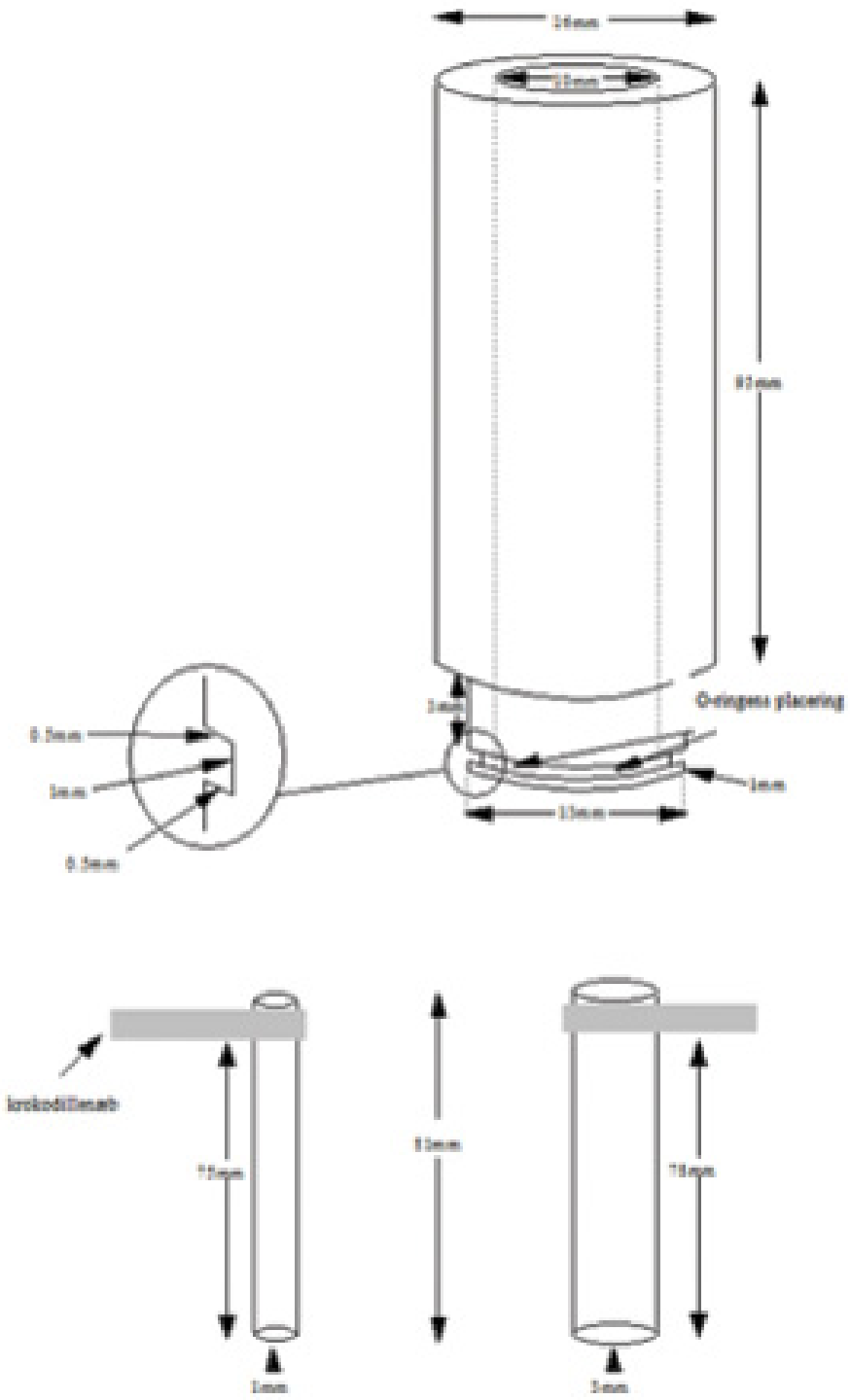
Apparatur Til Ter-Assay Med Rottehud



▼M8

Figur 2

Dimensioner På Anvendte Polytetrafluorethylen-Rør (Ptfe), Receptorrør Og Elektroder



Kritiske faktorer for det ovenfor viste apparatur:

— PTFE-rørets indvendige diameter

— længden af elektroderne i forhold til PTFE-røret og receptorrøret, så hudlappen ikke berøres af elektroderne, og så en konstant længde af elektroden er i kontakt med $MgSO_4$-opløsningen

▼**M8**

— mængden af $MgSO_4$-opløsning i receptorrøret bør sikre en væskedybde i forhold til niveauet i PTFE-røret som vist i figur 1

— hudlappen bør være tilstrækkeligt fastgjort til PTFE-røret, så den elektriske modstand er et sandt mål for hudens egenskaber.

▼**M8**

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (20).

C: ætsende.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (20).

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN)): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

OD: optisk tæthed.

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

▼M8

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (20).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (20).

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (20).

In vivo-hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (20).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Analyseserie: Et enkelt testkemikalie, der på samme tid testes i mindst tre hudlapsreplikater.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Transkutan elektrisk modstand (TER): et mål for hudens elektriske impedans som en modstand i kiloohm. En simpel og robust metode til vurdering af barrierefunktion, hvor ionernes passering gennem huden registreres ved hjælp af en wheatstone-bro.

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M8

B.40.A IN VITRO-HUDÆTSNING: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS (RhE)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 431 (2016). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1])]. Den opdaterede forsøgsmetode B.40.A indeholder en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i overensstemmelse med UN GHS og CLP. Den muliggør endvidere delvis underkategorisering af ætsende stoffer.

2. Vurderingen af kemikaliers hudætsningspotentiale har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (2). Ud over nærværende forsøgsmetode B.40.A er der blevet valideret og vedtaget to andre in vitro-forsøgsmetoder til testning af kemikaliers hudætsningspotentiale som TM B.40 (der svarer til OECD TG 430) (3) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (4). Derudover er in vitro-forsøgsmetoden B.46 (der svarer til OECD TG 439) (5) blevet vedtaget til testning af hudirritationspotentiale. Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (6).

3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudætsning. Den gør brug af rekonstrueret human epidermis (RhE) (fremstillet af humant afledte ikke-transformerede epidermiskeratinocytter), som ret nøje efterligner de histologiske, morfologiske, biokemiske og fysiologiske egenskaber af menneskehudens øverste lag, dvs. epidermis. Den tilsvarende OECD-testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2004 og opdateret i 2013 for at medtage yderligere forsøgsmetoder, der bruger RhE-modeller, og muligheden for at benytte metoderne til at understøtte underkategorisering af ætsende kemikalier. Endelig blev den opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og medtage anvendelsen af en alternativ procedure til måling af levedygtighed.

4. Fire validerede RhE-modeller, der kan fås i handelen, er inkluderet i denne forsøgsmetode. En række prævalideringsundersøgelser (7) efterfulgt af en formel valideringsundersøgelse til vurdering af hudætsning (8) (9) (10) er blevet gennemført (11) (12) for to af disse testmodeller, der kan fås i handelen, nemlig EpiSkin™ Standard Model (SM) og EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (er i det følgende betegnet som de validerede referencemetoder – VRM). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser henstilles det, at de to ovenfor nævnte VRM'er anvendes i lovgivningsøjemed til skelnen mellem ætsende (C) og ikke-ætsende (NC) stoffer,

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

▼M8

og at EpiSkin™ desuden anvendes til at understøtte underkategoriseringen af ætsende stoffer (13) (14) (15). To andre in vitro-RhE-testmodeller til vurdering af hudætsning, der også findes i handelen, har udvist resultater, som svarer til den validerede referencemetode (VRM) EpiDerm™ ifølge en PS-baseret validering (16) (17) (18). Det drejer sig om SkinEthic™ RHE ([1]) og epiCS® (tidligere benævnt EST-1000), der også kan benyttes i lovgivningsøjemed til skelnen mellem ætsende og ikke-ætsende stoffer (19) (20). Undersøgelser, som producenterne af RhE-modeller udførte efter validering i perioden 2012-2014 med en mere detaljeret protokol, der korrigerer for interferens som følge af testkemikaliernes uspecificerede MTT-reduktion, forbedrede ydeevnen både med hensyn til skelnen mellem C og NC og understøtning af underkategoriseringen af ætsende stoffer (21) (22). Der er foretaget yderligere statistiske analyser af de data, der blev genereret efter validering med EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og EpiCS®, for at identificere alternative forudsigelsesmodeller, som har forbedret forudsigelsesevnen i forbindelse med underkategorisering (23).

5. Inden der kan anvendes en foreslået lignende eller ændret in vitro-RhE-forsøgsmetode end VRM'erne til vurdering af hudætsning i lovgivningsøjemed, bør dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og begrænsningerne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'erne, i overensstemmelse med ydeevnestandarderne (PS) (24), der opstilles i henhold til principperne i OECD's vejledende dokument nr. 34 (25). Den gensidige anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret forsøgsmetode i henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den tilsvarende testvejledning. De testmodeller, der er medtaget i testvejledningen, kan anvendes til at opfylde forskellige landes krav til testresultater for in vitro-forsøgsmetoder til vurdering af hudætsning og drager samtidig fordel af den gensidige anerkendelse af data.

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Denne forsøgsmetode gør det muligt at identificere ikke-ætsende og ætsende stoffer og blandinger i henhold til UN GHS og CLP. Denne forsøgsmetode understøtter endvidere underkategoriseringen af ætsende stoffer og blandinger i den valgfrie underkategori 1A, jf. UN GHS (1), samt en kombination af underkategorierne 1B og 1C (21) (22) (23). Forsøgsmetoden er begrænset derved, at den ikke gør det muligt at skelne mellem underkategorierne for hudætsende stoffer 1B og 1C, jf. UN GHS og CLP, på grund af det begrænsede antal velkendte kemikalier, der tilhører underkategorien 1C for in vivo-ætsende stoffer. Testmodellerne EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS® gør det muligt at foretage denne underkategorisering (dvs. 1A versus 1B/1C versus NC).

8. En lang række kemikalier, der primært repræsenterer enkeltstoffer, er blevet testet under den validering, der understøtter de testmodeller, som er medtaget i denne forsøgsmetode, når de anvendes til identifikation af ikke-ætsende og ætsende stoffer. Valideringsundersøgelsens empiriske database indeholdt 60 kemikalier fra en bred vifte af kemiske grupper (8) (9) (10). Forsøgsmetodens udviklere gennemførte forsøg til påvisning af følsomhed, specificitet,

([1]) Forkortelsen RhE (= Reconstructed human Epidermis) anvendes for alle modeller, der er baseret på RhE-teknologi. Forkortelsen RHE, som den bruges sammen med SkinEthic™-modellen, har den samme betydning, men skrives med store bogstaver, da den indgår i handelsnavnet for denne specifikke forsøgsmetode.

▼M8

nøjagtighed og assayets reproducerbarhed internt i laboratoriet med henblik på underkategorisering, og resultaterne blev gennemgået af OECD (21) (22) (23). På baggrund af alle tilgængelige data kan forsøgsmetoden anvendes på en lang række kemiske grupper og fysiske tilstande, herunder væsker, halvfaste stoffer, faste stoffer og voks. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at de testmodeller, der er medtaget i denne forsøgsmetode, ikke er egnede til en specifik kategori af testkemikalier, bør de ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af testkemikalier. Eftersom forsøgsmetoden kan anvendes på stoffer, forventes den desuden at kunne anvendes på blandinger. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som foreslået i (26)), ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af blandinger. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (8) (9) (10). Selv om det er tænkeligt, at gasser og aerosoler kan undersøges ved hjælp af RhE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode det ikke.

9. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan, og testkemikalier, som direkte kan reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan interferere med målinger af vævets levedygtighed og kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner. Hvilken type af tilpassede kontroller, der kan være nødvendig, vil variere alt efter den type interferens, testkemikaliet fremkalder, og den procedure, der benyttes til at måle MTT-formazan (jf. punkt 25-31).

10. Denne forsøgsmetode giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 specifikt vedrører in vitro-test af hudirritationer og er baseret på det samme RhE-testsystem, dog med en anden protokol (5). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (6). Denne IATA-strategi omfatter gennemførelse af in vitro-test for hudætsning (som beskrevet i forbindelse med denne forsøgsmetode) og hudirritation, inden test i levende dyr overvejes. Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testkemikaliet påføres på en tredimensional RhE-model, som består af ikke-transformerede humant afledte epidermiskeratinocytter, som ved dyrkning har dannet en stærkt differentieret flerlagsmodel af den humane epidermis. Den består af velordnede basallag, stratum spinosum og stratum granulosum og et flerlaget stratum corneum med intercellulære lamellære lipidlag fra samme lipidklasser som dem, man finder in vivo.

▼M8

12. RhE-forsøgsmetoden er baseret på den præmis, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum ved diffusion eller erosion og er cytotoksiske for cellerne i de underliggende lag. Cellernes levedygtighed måles ved, at enzym omdanner vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazolium-bromid; CAS-nummer 298-93-1) til et blåt formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (27). Ætsende kemikalier identificeres ved deres evne til at nedsætte cellernes levedygtighed til under en bestemt tærskelværdi (jf. punkt 35 og 36). Den RhE-baserede forsøgsmetode til vurdering af hudætsning har vist sig at kunne forudsige in vivo-hudætsning hos kaniner vurderet i henhold til TM B.4 (2).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

13. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en eller flere af de fire validerede RhE-testmodeller, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 12 kompetencestoffer, der står opført i tabel 1. Såfremt der anvendes en metode til underklassificering, bør også den korrekte underkategorisering påvises. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (24)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 1

Liste over kompetencestoffer ([1])

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ([2])	UN GHS-/CLP-kat. baseret på in vivo-resultater ([3])	VRM-kat. baseret på in vitro-resultater ([4])	MTT-reduktionsmiddel ([5])	Fysisk tilstand
Underkategori 1A in vivo – ætsende stoffer						
Bromeddikesyre	79-08-3	Organisk syre	1A	(3) 1A	—	S
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Uorganisk syre	1A	(3) 1A	—	L
Phenol	108-95-2	Phenol	1A	(3) 1A	—	S
Dichloracetylchlorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	—	L
Kombination af underkategorierne 1B og 1C in vivo – ætsende stoffer						
Glyoxylsyremonohydrat	563-96-2	Organisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	—	S
Mælkesyre	598-82-3	Organisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	—	L
Ethanolamin	141-43-5	Organisk base	1B	(3) 1B/1C	Y	Viskøs

▼**M8**

Stof	CAS RN	Kemisk gruppe ([2])	UN GHS-/CLP-kat. baseret på in vivo-resultater ([3])	VRM-kat. baseret på in vitro-resultater ([4])	MTT-reduktionsmiddel ([5])	Fysisk tilstand
Underkategori 1A in vivo – ætsende stoffer						
Saltsyre (14,4 %)	7647-01-0	Uorganisk syre	1B/1C	(3) 1B/1C	—	L
In vivo – ikke-ætsende stoffer						
Phenethylbromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organisk base	NC	(3) NC	—	S
4-(methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinsyre	143-07-7	Organisk syre	NC	(3) NC	—	S

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; VRM = valideret referencemetode; NC = Ikke ætsende; Y = ja; S = fast; L = flydende

([1]) Kompetencestofferne, der først er sorteret efter deres ætsende versus ikke-ætsende egenskaber, dernæst efter deres underkategori for ætsende stoffer og endelig efter deres kemiske gruppe, er udvalgt blandt de stoffer, der blev anvendt i ECVAM-valideringsundersøgelserne af EpiSkin™ og EpiDerm™ (8) (9) (10) og efter undersøgelser efter validering baseret på data fra udviklerne af EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® (23). Medmindre andet er angivet, er stofferne testet ved det renhedsniveau, de havde, da de blev købt (8) (10). De udvalgte stoffer omfatter så vidt muligt stoffer, der: i) er repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, svagt til kraftigt ætsende), som VRM'erne er i stand til at måle eller forudsige, ii) er repræsentative for de kemiske grupper, der blev anvendt i valideringsundersøgelserne, iii) har veldefinerede kemiske strukturer, iv) giver reproducerbare resultater i VRM'erne, v) giver definitive resultater i in vivo-referenceforsøgsmetoden, vi) findes i handelen og vii) ikke er forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

([2]) Kemisk gruppe, jf. Barratt et al. (8).

([3]) De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS/CLP 1A, 1B og 1C.

([4]) VRM-in vitro-forudsigelserne i denne tabel blev opnået med EpiSkin™- og EpiDerm™-testmodellerne (VRM'erne) ved testning efter validering foretaget af forsøgsmetodens udviklere.

([5]) De værdier for levedygtighed, der blev opnået i ECVAM-valideringsundersøgelserne for hudætsning, blev ikke korrigeret for direkte MTT-reduktion (der blev ikke foretaget døde kontroller under valideringsundersøgelserne). De data, der blev genereret efter validering af forsøgsmetodens udviklere, og som fremgår af denne tabel, er dog opnået med tilpassede kontroller (23).

14. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugeren kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af RhE-modellens fabrikant. Det er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lang afstand/lange perioder. Når en forsøgsmetode er blevet helt fastlagt, og kompetencen er blevet påvist, er det ikke nødvendigt at kontrollere disse egenskaber rutinemæssigt. Ved rutinemæssig brug af en forsøgsmetode anbefales det imidlertid at kontrollere barriereegenskaberne med jævne mellemrum.

FREMGANGSMÅDE

15. Følgende er en generisk beskrivelse af komponenter og procedurer i RhE-testmodellerne til vurdering af hudætsning, som er omfattet af denne forsøgsmetode. De RhE-modeller, der er godkendt som videnskabeligt egnede til brug inden for denne forsøgsmetode, dvs. modellerne EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE og epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), kan købes i handelen. Der findes standardprocedurer (SOP'er) for disse fire RhE-modeller (34) (35) (36) (37), og de vigtigste komponenter i forsøgsmetoden er opsummeret i tillæg 2. Det

▼M8

anbefales at følge de relevante standardprocedurer, når en af disse modeller implementeres og anvendes i laboratoriet. Testning med de fire RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, bør overholde følgende betingelser:

KOMPONENTER I RHE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

16. Der skal anvendes ikke-transformerede humane keratinocytter til at rekonstruere epithel. Der skal være flere lag af levedygtige epithelceller (basallag, stratum spinosum, stratum granulosum) til stede under et fungerende stratum corneum. Stratum corneum skal være flerlaget og have den lipidprofil, der gør den til en effektiv barriere, som kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske referencekemikalier, f.eks. natriumdodecylsulphat (SDS) eller Triton X-100. Barrierefunktionen bør påvises og kan vurderes enten ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC_{50}) efter en fast eksponeringstid, eller ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at reducere cellernes levedygtighed med 50 % (ET_{50}), når referencekemikaliet påføres i en nærmere angivet fast koncentration (jf. punkt 18). RhE-modellens fysiske udformning skal forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv, hvilket ville forringe modelleringen af hudens eksponering. RhE-modellen skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

17. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af vævslevedygtigheden (27). Levedygtige celler i RhE-modellen reducerer vitalfarvestoffet MTT til blåt MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelse af isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). OD af ekstraktionsmidlet alene bør være tilstrækkeligt lille, dvs. OD < 0,1. Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres enten ved måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (38). Brugerne af RhE-modellen bør sikre, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør fastsætte et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol. Intervallerne for de acceptable OD-værdier for negativ kontrol for de fire validerede RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, er anført i tabel 2. En bruger af HPLC-/UPLC-spektrofotometri bør anvende de OD-intervaller for negativ kontrol, der er anført i tabel 2, som acceptkriterier for den negative kontrol. Det skal godtgøres, at det væv, der er behandlet med det negative kontrolstof, har stabil kultur (giver enslydende OD-målinger) i hele eksponeringsperioden.

Tabel 2

Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol ved kontrol af batchkvalitet

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼**M8**

Barrierefunktion

18. Stratum corneum og dets lipidsammensætning bør være tilstrækkelig til at modstå hurtig gennemtrængning af visse cytotoksiske referencekemikalier (f.eks. SDS eller Triton X-100), bestemt ved IC_{50} eller ET_{50} (tabel 3). Udvikleren/leverandøren af den anvendte RhE-model bør påvise barrierefunktionen for hver batch af RhE-modellen ved levering af vævene til slutbrugeren (jf. punkt 21).

Morfologi

19. Der foretages en histologisk undersøgelse af RhE-modellen, som påviser en flerlaget human epidermis-lignende struktur indeholdende stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum og stratum corneum og udviser en lipidprofil som den, man finder i human epidermis. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør ved levering af vævene til slutbrugeren forelægge en histologisk undersøgelse af hver batch af den anvendte RhE-model, som påviser vævenes egnede morfologi (jf. punkt 21).

Reproducerbarhed

20. Brugerne af forsøgsmetoderne skal påvise forsøgsmetodernes reproducerbarhed over tid med positive og negative kontroller. Derudover bør en forsøgsmetode kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren af RhE-modellen forelægger data, som påviser reproducerbarheden over tid med ætsende og ikke-ætsende kemikalier fra f.eks. listen over kompetencestoffer (tabel 1). Hvis en forsøgsmetode anvendes til underkategorisering, skal reproducerbarheden med hensyn til underkategorisering også påvises.

Kvalitetskontrol (QC)

21. RhE-modellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 17), barrierefunktion (punkt 18) og morfologi (punkt 19) er de vigtigste. Brugerne af forsøgsmetoden gives adgang til disse data, således at de kan medtage disse oplysninger i testrapporten. Kun resultater, der er fremkommet med QC-accepterede batcher af væv, kan accepteres til at forudsige de ætsende stoffers klassificering på pålidelig vis. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen fastsætter et acceptinterval (øvre og nedre grænse) for IC50 eller ET50. Acceptintervallerne for de fire validerede testmodeller er angivet i tabel 3.

Tabel 3

QC-batchgodkendelseskriterier

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM) (behandling i 18 timer med SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 timer	ET50 = 8,7 timer
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 timer	ET50 = 10,0 timer
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 timer	ET50 = 7,0 timer

▼M8

Påføring af testkemikaliet og kontrolkemikalier

22. Der anvendes mindst to vævsprøver for hvert testkemikalie og hver kontrol i hver eksponeringsperiode. For både flydende og faste kemikalier gælder det, at der bør påføres tilstrækkelig meget testkemikalie til, at epidermisoverfladen dækkes med et jævnt lag, samtidig med at ubegrænsede doser undgås, dvs. mindst 70 µl/cm^2 eller 30 mg/cm^2. Alt efter modellerne fugtes epidermisoverfladen med deioniseret eller destilleret vand inden påføring af faste kemikalier for at forbedre kontakten mellem testkemikaliet og epidermisoverfladen (34) (35) (36) (37). Faste stoffer bør testes som fint pulver, når det overhovedet er muligt. Påføringsmetoden skal være egnet til det pågældende testkemikalie (se f.eks. henvisning (34-37)). Efter eksponeringsperiodenskal testkemikaliet omhyggeligt vaskes af epidermis med en vandig buffer eller 0,9 % NaCl. Alt efter hvilken af de fire validerede RhE-testmodeller der benyttes, anvendes to eller tre eksponeringsperioder pr. testkemikalie (for alle fire gyldige RhE-modeller: 3 min. og 1 time; for EpiSkin™ en yderligere eksponeringstid på fire timer). Alt efter den anvendte RhE-testmodel og den vurderede eksponeringsperiode kan inkubationstemperaturen under eksponering variere mellem stuetemperatur og 37 °C.

23. Der bør i hver analyseserie anvendes sideløbende negative og positive kontroller (PC), så det påvises, at levedygtigheden (med negative kontroller), barrierefunktionen og vævets deraf følgende følsomhed (med PC) ligger inden for et forud fastsat acceptinterval. De foreslåede PC-kemikalier er iseddikesyre og 8N KOH, alt afhængigt af den anvendte RhE-model. Det skal bemærkes, at 8N KOH er et direkte MTT-reduktionsmiddel, der kan kræve tilpassede kontroller som beskrevet i punkt 25 og 26. Som negativt kontrolstof foreslås 0,9 % (w/v) NaCl eller vand.

Måling af cellelevedygtighed

24. MTT-assayet, som er et kvantitativt assay, skal benyttes til måling af cellelevedygtigheden i forbindelse med denne forsøgsmetode (27). Vævsprøven anbringes i en MTT-opløsning af passende koncentration (0,3 eller 1 mg/ml) i tre timer. Det udfældede blå formazan ekstraheres fra vævet med et opløsningsmiddel (f.eks. isopropanol eller sur isopropanol), og formazankoncentrationen måles ved bestemmelse af OD ved 570 nm i et højst ± 30 nm bredt filterbånd eller ved en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 30 og 31) (38).

25. Testkemikalier kan interferere med MTT-assayet enten ved direkte reduktion af MTT til blåt formazan og/eller ved farveinterferens, hvis testkemikaliet naturligt eller på grund af behandlingsprocedurer absorberer i det samme OD-interval som formazan (570 ± 30 nm, primært blå og violette kemikalier). Der bør anvendes yderligere kontroller til at påvise og korrigere for testkemikaliernes potentielle interferens, såsom kontrol af ikke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) og kontrol af ikke-specifik farve (NSC) (jf. punkt 26-30). Dette er især vigtigt, når et bestemt testkemikalie ikke fjernes helt fra vævet ved skylning, eller når det trænger igennem epidermis og derfor er til stede i vævet, når MTT-levedygtighedstesten udføres. Det er nærmere beskrevet, hvordan der korrigeres for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens, i SOP'erne for testmodellerne (34) (35) (36) (37).

▼M8

26. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til et frisklavet MTT-medium (34) (35) (36) (37). Hvis MTT-blandingen, når den indeholder testkemikaliet, bliver blå/violet, formodes testkemikaliet at reducere MTT direkte, og der bør udføres yderligere funktionsmæssig kontrol på ikke-levedygtig epidermis, uanset om der anvendes måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure. Ved denne yderligere funktionsmæssige kontrol anvendes dødt væv, der kun har metabolisk residualaktivitet, men absorberer testkemikaliet på samme måde som levedygtigt væv. Hvert MTT-reducerende kemikalie påføres på mindst to døde vævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele hudætsningstesten. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for MTT-reduktionsmiddel minus procenten for ikke-specifik MTT-reduktion opnået med dødt væv eksponeret for det samme MTT-reduktionsmiddel, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT).

27. For at identificere potentiel interferens fra farvede testkemikalier eller testkemikalier, der bliver farvet, når de kommer i kontakt med vand eller isopropanol, og afgøre, om der skal iværksættes yderligere kontrol, bør der foretages spektralanalyse af testkemikaliet i vand (miljø under eksponering) og/eller isopropanol (ekstraktionsopløsning). Hvis testkemikaliet i vand og/eller isopropanol absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm, bør der foretages yderligere kontroller med farvestof, eller der kan anvendes en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure, i hvilket tilfælde disse kontroller ikke er nødvendige (jf. punkt 30 og 31). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende farvet testkemikalie på mindst to levedygtigevævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele hudætsningstesten, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen skal udføres sideløbende pr. eksponeringsperiode pr. farvet testkemikalie (i hver analyseserie) som følge af det levende vævs iboende biologiske variabilitet. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning minus procenten for ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT foretaget sideløbende med den test, der korrigeres (%NSC_{living}).

28. Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), vil testkemikalier, der identificeres som fremkaldende både direkte MTT-reduktion (jf. punkt 26) og farveinterferens (jf. punkt 27), også kræve en tredje kontrol ud over NSMTT- og NSC_{living}-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor. Dette er sædvanligvis tilfældet med mørke testkemikalier, der interfererer med MTT-assayet (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt 26. Disse testkemikalier kan binde sig til både levende og dødt væv, og derfor kan NSMTT-kontrollen ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliet binder sig til dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC_{living}-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliet binder sig til levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektion for farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSCkilled). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliet på mindst to døde vævsprøver pr. eksponeringsperiode, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under

▼**M8**

MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC_{killed}-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyseserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og om muligt med den samme vævsbatch. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliet minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procenten for ikke-specifik farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSC_{killed}).

29. Det er vigtigt at bemærke, at ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge de aflæste værdier for vævsekstraktet til over spektrofotometrets linearitetsinterval. På denne baggrund bør laboratorierne fastlægge linearitetsintervallet for deres spektrofotometer med MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7), der er købt i handelen, inden de begynder at undersøge testkemikalier i lovgivningsøjemed. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er især egnet til at vurdere direkte MTT-reduktionsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliet uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval, eller når den ikke-korrigerede levedygtighedsprocent opnået med testkemikaliet allerede definerer det som ætsende (jf. punkt 35 og 36). Ikke desto mindre bør resultaterne for testkemikalier, der fremkalder %NSMTT og/eller %NSC_{living} på > 50 % af den negative kontrol, tages med forsigtighed.

30. For farvede testkemikalier, som ikke er kompatible med måling af standardabsorbans (OD) som følge af deres for kraftige interferens i MTT-assayet, kan den alternative HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure til måling af MTT-formazan anvendes (jf. punkt 31) (37). HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra testkemikaliet før kvantificering (38). Af denne grund kræves NSCliving- eller NSCkilled-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør dog benyttes, hvis testkemikaliet mistænkes for at være direkte MTT-reducerende eller har en farve, som forhindrer vurderingen af dets evne til direkte at reducere MTT (som beskrevet i punkt 26). Ved benyttelse af HPLC-/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes procenten for vævslevedygtighed som procentdelen af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeresfor testkemikaliet, set i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der er direkte MTT-reducerende, beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliet minus %NSMTT. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-reduktionsmidler, der også kan være farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så kraftigt, at de fører til OD-værdier (ved måling af standard-OD) eller toparealer (ved UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, der falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes, skønt dette kun forventes at forekomme i meget sjældne situationer.

▼M8

31. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan også anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-reducerende og ikke-MTT-reducerende) til måling af MTT-formazan (38). Da der findes mange forskellige HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemer, bør HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemets kvalificering påvises før anvendelsen heraf til at kvantificere MTT-formazan fra vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne for en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien for bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (38) (39). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 4. Når acceptkriterierne i tillæg 4 er opfyldt, anses HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

32. For hver forsøgsmetode med egnede RhE-modeller bør væv behandlet med den negative kontrol udvise OD-værdier, der afspejler vævets kvalitet som beskrevet i tabel 2 og ikke er lavere end de forud fastsatte grænser. Væv behandlet med PC, dvs. iseddikesyre eller 8N KOH, bør afspejle vævets evne til at reagere på et ætsende kemikalie under de betingelser, der gælder for testmodellen (jf. tillæg 2). Variabiliteten mellem vævsprøver til testkemikalie og/eller kontrolkemikalier bør ligge inden for de accepterede grænser for hver egnet RhE-model (jf. tillæg 2) (f.eks. bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %). Hvis enten den negative kontrol eller PC i en analyseserie falder uden for de accepterede intervaller, anses analyseserien for ikke at være kvalificeret, og den bør gentages. Hvis testkemikaliernes variabilitet falder uden for det opstillede interval, bør de testes på ny.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

33. De OD-værdier, der opnås for hvert testkemikalie, anvendes til beregning af den procentvise levedygtighed i forhold til den negative kontrol, som sættes til 100 %. Hvis der benyttes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, beregnes procenten for vævslevedygtighed som procenten af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikaliet, i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. De procentvise tærskelværdier for cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende testkemikalier (eller som skelner mellem forskellige underkategorier for ætseevne), defineres nedenfor i punkt 35 og 36 for hver af de testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, og bør anvendes til at fortolke resultaterne.

34. En analyseserie bestående af mindst to vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringsresultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger kan det overvejes at gennemføre en anden analyseserie samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier er diskordante.

35. Forudsigelsesmodellen for EpiSkin™-testmodellen til vurdering af hudætsning (9) (34) (22), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises i tabel 4:

▼M8

Tabel 4

EpiSkin™-forudsigelsesmodel

Levedygtighed målt efter eksponeringstid (t=3, 60 og 240 minutter)	Forudsigelse, der skal tages i betragtning
< 35 % efter 3 min. eksponering	***Ætsende:*** • Valgfri underkategori 1A (*)
≥ 35 % efter 3 min. eksponering **OG** < 35 % efter 60 min. eksponering **ELLER** ≥ 35 % efter 60 min. eksponering **OG** < 35 % efter 240 min. eksponering	***Ætsende:*** • En kombination af de valgfrie underkategorier 1B/ 1C
≥ 35 % efter 240 min. eksponering	**Ikke-ætsende**

(*) Ifølge data genereret med henblik på at vurdere RhE-testmodellernes egnethed til at understøtte underkategorisering blev det påvist, at omkring 22 % af underkategori 1A-resultaterne for EpiSkin™-testmodellen måske rent faktisk består af underkategori 1B- eller 1C-stoffer/-blandinger (dvs. at de er overklassificeret) (jf. tillæg 3).

36. Forudsigelsesmodellerne for testmodellerne til vurdering af hudætsning EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) og epiCS® (16) (23) (37), der hidrører fra UN GHS-/CLP-klassificeringssystemet, vises i tabel 5:

Tabel 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®

Levedygtighed målt efter eksponeringstid (t=3 og 60 minutter)	Forudsigelse, der skal tages i betragtning
TRIN 1 for EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®	
< 50 % efter 3 min. eksponering	***Ætsende***
≥ 50 % efter 3 min. eksponering **OG** < 15 % efter 60 min. eksponering	***Ætsende***
≥ 50 % efter 3 min. eksponering **OG** ≥ 15 % efter 60 min. eksponering	**Ikke-ætsende**
TRIN 2 for EpiDerm™ SCT – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	
< 25 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*
≥ 25 % efter 3 min. eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B og 1C
TRIN 2 for SkinEthic™ RHE – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	
< 18 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*

▼M8

Levedygtighed målt efter eksponeringstid (t=3 og 60 minutter)	Forudsigelse, der skal tages i betragtning
TRIN 1 for EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®	
≥ 18 % efter 3 min eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B og 1C
TRIN 2 for epiCS® – for stoffer/blandinger, der blev identificeret som ætsende i trin 1	
< 15 % efter 3 min. eksponering	Valgfri underkategori 1A*
≥ 15 % efter 3 min. eksponering	En kombination af de valgfrie underkategorier 1B og 1C

DATA OG RAPPORTERING

Data

37. For hver test bør data fra de enkelte vævsprøver (f.eks. OD-værdier og beregnet cellelevedygtighedsprocent for hvert testkemikalie samt klassificeringen) fremlægges i tabelform, herunder data fra eventuelle gentagelser af forsøget. Derudover bør gennemsnitsværdier og intervaller for levedygtighed og variationskoefficienter mellem vævsprøverne for hver enkelt test fremlægges. For hvert testet kemikalie fremlægges de direkte MTT-reduktionsmidlers eller farvede testkemikaliers iagttagne interaktioner med MTT-reagenset.

Testrapport

38. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolkemikalier:

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

— fysisk udseende, vandopløselighed og eventuelle yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— oprindelse, evt. batchnummer

— behandling af testkemikaliet/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt

— opbevaringsforhold.

Anvendt RhE-model og protokol og begrundelse herfor (hvis relevant)

Testbetingelser:

— anvendt RhE-model (herunder batchnummer)

▼**M8**

— kalibreringsoplysninger for måleudstyr (f.eks. spektrofotometer), bølgelængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval

— beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan

— eventuelt beskrivelse af kvalificeringen af HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet

— komplet dokumentation for den anvendte RhE-model, herunder om dens ydeevne. Der bør bl.a. gives oplysninger om:

i) levedygtighed

ii) barrierefunktion

iii) morfologi

iv) reproducerbarhed og forudsigelsesevne

v) kvalitetskontroller (QC) af modellen

— reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysning om, hvorvidt QC-dataene kan accepteres, sammenlignet med historiske batchdata

— påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencestofferne.

Testprocedure:

— detaljer om den anvendte testprocedure (herunder anvendte vaskeprocedurer efter eksponering)

— anvendte doser af testkemikalie og kontrolkemikalier

— eksponeringsperiodens/-periodernes varighed og eksponeringstemperatur(er)

— eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier

— antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (PC, negativ kontrol og NSMTT, NSCliving og NSCkilled, hvis relevant) pr. eksponeringsperiode

— beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel baseret på den anvendte RhE-model

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden (herunder vaskeprocedurer).

Acceptkriterier for analyseserier og test:

— middelværdier for positive og negative kontroller og acceptintervaller på grundlag af historiske data

— acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol

▼M8

— acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliet.

Resultater:

— angivelse i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie og hver enkelt kontrol, for hver eksponeringsperiode, hver analyseserie og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent, vævsprøveforskelle, eventuelle standardafvigelser og/eller variationskoefficienter

— eventuelle resultater af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvende testkemikalier, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, vævsprøveforskelle, eventuelle standardafvigelser og/eller CV'er og endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent

— resultater opnået med testkemikaliet/-kemikalierne og kontrolkemikalierne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York og Geneva. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.

(3) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning.

(4) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.

(5) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., og Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6. ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., og Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., og Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. og Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. og Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. og Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., og Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. og Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., og Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., og Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M og Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. og Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889-891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J og Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211-225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. og Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS og Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF og Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) Cell-Systems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., og McNamee P. Use of HPLC/UPLC-spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Tilgængelig på: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (25).

Cellelevedygtighed: en parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation, f.eks. udtrykt ved de cellulære mitochondriedehydrogenasers evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt], og som, afhængigt af det valgte endepunkt og testens udformning, korrelerer med det totale antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (25).

ET_{50}: kan bedømmes ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte cellernes levedygtighed med 50 % ved påføring af referencekemikaliet i en nærmere angivet fast koncentration, se også IC_{50}.

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtryksvæskekromatografi)

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

IC_{50}: kan bedømmes ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC_{50}) efter en fast eksponeringstid, se også ET_{50}.

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på epidermis ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epidermisoverfladen på ensartet måde.

Blanding: en blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

▼M8

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazoliumbromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på > 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

NSC_{killed}-kontrol: kontrol af ikke-specifik farve i dødt væv.

NSC_{living}-kontrol: kontrol af ikke-specifik farve i levende væv.

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

OD: optisk tæthed.

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det bør påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (25).

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (25).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (25).

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en PC.

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (25).

▼**M8**

Hudætsning: in vivo: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil fire timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (25).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskekromatografi).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M8

Tillæg 2

VIGTIGSTE KOMPONENTER I RHE-TESTMODELLER, SOM ER VALIDERET TIL VURDERING AF HUDÆTSNING

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modelareal	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Antal vævsprøver	Mindst to pr. eksponeringsperiode	To-tre pr. eksponeringsperiode	Mindst to pr. eksponeringsperiode	Mindst to pr. eksponeringsperiode
Behandlingsdoser og påføring	Væsker og viskøse stoffer: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Faste stoffer: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl-opløsning (9 g/l) Voks/klæbrige stoffer: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) med et nylonnet	Væsker: 50 µl (79,4 µl/cm^2) med eller uden et nylonnet *Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet* Halvfaste stoffer: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Faste stoffer: 25 µl H_2O (eller mere om nødvendigt) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Voks: flad "småkage" med en diameter på ca. 8 mm anbragt oven på vævet og befugtet med 15 µl H_2O.	Væsker og viskøse stoffer: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) ved anvendelse af nylonnet *Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet* Faste stoffer: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Voks/klæbrige stoffer: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) ved anvendelse af nylonnet	Væsker: 50 µl (83,3 µl/cm^2) ved anvendelse af nylonnet *Forudgående test af testkemikaliets kompatibilitet med nylonnet* Halvfaste stoffer: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Faste stoffer: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (eller mere om nødvendigt) Voks: flad "småkage" med en diameter på ca. 8 mm anbragt oven på vævet og befugtet med 15 µl H_2O.
Forhåndskontrol for direkte MTT-reduktion	50 µl (væske) eller 20 mg (fast stof)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml opløsning i 180 ± 5 min. ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof)+ 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.	40 µl (væske) eller 20 mg (fast stof)+ 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof)+ 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller.

▼M8

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Forhåndskontrol for farveinterferens	10 µl (væske) eller 10 mg (fast stof) + 90 µl H_2O blandet i 15 min. ved stuetemperatur → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 300 µl H_2O i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	40 µl (væske) eller 20 mg (fast stof) + 300 µl H_2O blandet i 60 min. ved stuetemperatur → Hvis testkemikaliet er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.	50 µl (væske) eller 25 mg (fast stof) + 300 µl H_2O i 60 min. ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Hvis opløsningen bliver farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller.
Eksponering – tid og temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) og 240 min (± 10 min) i et ventileret kammer stuetemperatur (RT, 18-28 °C)	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min ved RT og 60 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Skylning	25 ml 1x PBS (2 ml/ad gangen)	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS	20 gange med en jævn blid stråle af 1x PBS
Negativ kontrol	50 µl NaCl-opløsning (9 g/l) Testet med hver eksponeringstid	50 µl H_2O Testet med hver eksponeringstid	40 µl H_2O Testet med hver eksponeringstid	50 µl H_2O Testet med hver eksponeringstid
Positiv kontrol	50 µl iseddikesyre Kun testet i fire timer	50 µl 8N KOH Testet med hver eksponeringstid	40 µl 8N KOH Kun testet i en time	50 µl 8N KOH Testet med hver eksponeringstid
MTT-opløsning	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubation – tid og temperatur	180 min (± 15 min) ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min) ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min ved 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Testmodellernes komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Ekstraktionsopløsningsmiddel	500 µl sur isopropanol (0,04 N HCl i isopropanol) (det isolerede væv er helt nedsænket)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)
Ekstraktion – tid og temperatur	Natten over ved RT, beskyttet mod lys	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT	Natten over uden rystning ved RT eller i 120 min med rystning (~ 120 o/min.) ved RT
OD-aflæsning	570 nm (545 - 595 nm) uden referencefilter	570 nm (eller 540 nm) uden referencefilter	570 nm (540 - 600 nm) uden referencefilter	540 - 570 nm uden referencefilter
Kvalitetskontrol af væv	behandling i 18 timer med SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	behandling med 1 % Triton X-100 4,08 timer ≤ ET_{50} ≤ 8,7 timer	behandling med 1 % Triton X-100 4,0 timer ≤ ET_{50} ≤ 10,0 timer	behandling med 1 % Triton X-100 2,0 timer ≤ ET_{50} ≤ 7,0 timer
Acceptkriterier	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (NaCl) bør være ≥ 0,6 og ≤ 1,5 for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i fire timer for positivt kontrolstof (iseddikesyre), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 20 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD ≥ 0,3 bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H_2O) bør være ≥ 0,8 og ≤ 2,8 for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 15 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed bør variationskoefficienten (CV) mellem vævsprøverne være ≤ 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H_2O) bør være ≥ 0,8 og ≤ 3,0 for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time (og eventuelt fire timer) for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 15 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD ≥ 0,3 bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof (H_2O) bør være ≥ 0,8 og ≤ 2,8 for hver eksponeringstid. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i en time for positivt kontrolstof (8N KOH), udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 20 %. 3. I intervallet 20-100 % levedygtighed og ved OD ≥ 0,3 bør forskellen i levedygtighed mellem de to vævsprøver ikke overstige 30 %.

▼M8

Tillæg 3

TESTMODELRESULTATER VED UNDERKATEGORISERING

Nedenstående tabel viser resultaterne for de fire testmodeller beregnet ud fra et sæt med 80 kemikalier, som er testet af de fire testudviklere. Beregningerne blev foretaget af OECD's sekretariat og gennemgået og godkendt af en ekspertundergruppe (21) (23).

Testmodellerne EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® er i stand til at foretage denne underkategorisering (dvs. 1A versus 1B/1C versus NC).

Resultater, overklassificeringsprocenter, underklassificeringsprocenter og nøjagtighed (forudsigelsesevne) for de fire testmodeller baseret på et sæt med 80 kemikalier, som alle blev testet i to eller tre analyseserier i hver testmodel:

STATISTIKKER OVER FORUDSIGELIGHED OPNÅET I HELE KEMIKALIESÆTTET

(n= 80 kemikalier testet i to uafhængige analyseserier for epiCS® eller tre uafhængige analyseserier for EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ og SkinEthic™ RHE, dvs. henholdsvis 159 (*) eller 240 klassificeringer)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Overklassificeringer:				
1B/1C overklassificeret 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC overklassificeret 1B/1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC overklassificeret 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Overklassificeret korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Samlet overklassificeringsprocent (alle kategorier)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Underklassificeringer:				
1A underklassificeret 1B/1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A underklassificeret NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B/1C underklassificeret NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Samlet underklassificeringsprocent (alle kategorier)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Korrekte klassificeringer:				
1A korrekt klassificeret	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B/1C korrekt klassificeret	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC korrekt klassificeret	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Generel nøjagtighed	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Ikke-ætsende

(*) et kemikalie blev testet en gang i epiCS® på grund af manglende tilgængelighed (23)

▼**M8**

Tillæg 4

Nøgleparametre og acceptkriterier for kvalificering af et HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystem til måling af MTT-formazan ekstraheret fra RhE-væv

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (37) (38)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, »living blank« (isopropanolekstrakt fra levende RhE-væv uden behandling), »dead blank« (isopropanolekstrakt fra dødt RhE-væv uden behandling)	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$ (1)
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Matrixvirkning	Kvalitetskontroller i »living blank« (n=5)	85 % ≤ matrixvirkning i % ≤ 115 %
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ (2) standard	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: %Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ Kvalitetskontroller: %Dev ≤ 15 % og CV ≤ 15 %
Reproducerbarhed (over flere dage)	Dag 1: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 2: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 3: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i »living blank«; (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	%Dev ≤ 15 %
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i »living blank« (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved en bestemt temperatur (f.eks. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller, dvs. 200 µg/ml.

▼B

B.41. **IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST**

1. **METODE**

Denne metode er ækvivalent med OECD TG 432 (2004).

1.1. INDLEDNING

Fototoksicitet defineres som det toksiske respons på et stof, der påføres kroppen, og som enten er blevet fremkaldt af eller forstærket af (kan konstateres ved lavere doser) eksponering for lys, eller som er forårsaget af bestråling af huden efter systemisk indgift af et stof.

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten anvendes til at afdække det fototoksiske potentiale i et testmateriale, når det exciteres ved lyspåvirkning. Testen evaluerer fotocytotoksicitet ud fra den relative reduktion i levedygtigheden af de celler, der udsættes for det kemiske stof under lyspåvirkning, sammenlignet med samme situation uden lys. De stoffer, som identificeres ved denne test, er sandsynligvis fototoksiske in vivo efter systemisk påføring og fordeling på huden eller efter lokal påføring.

Der er rapporteret om mange typer kemiske stoffer, der fremkalder fototoksiske virkninger (1)(2)(3)(4). Et fælles træk er deres evne til at absorbere lysenergi inden for sollysets spektrum. Ifølge fotokemiens grundlov (Grotthaus-Draper-loven) forudsætter fotoreaktion en tilstrækkelig optaget lysmængde. Derfor skal man, inden man overvejer en biologisk testning, bestemme testkemikaliets absorptionsspektrum for UV/synligt lys i henhold til OECD Test Guideline 101. Det er påstået, at det kemiske stof sandsynligvis ikke er fotoreaktivt, hvis den molære ekstinktions- og absorptionskoefficient er mindre end 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1}. Et kemisk stof af denne type behøver ikke nødvendigvis at blive testet i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten eller i nogen anden biologisk test for skadelige fotokemiske virkninger (1)(5). Se også bilag 1.

Pålideligheden og relevansen af in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er blevet evalueret for nylig (6)(7)(8)(9). In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten har vist sig at kunne forudsige akutte fototoksicitetsvirkninger på dyr og mennesker in vivo. Testen er ikke beregnet til at forudsige andre skadelige virkninger, der måtte opstå fra samtidig påvirkning fra et kemisk stof og lys. Eksempelvis påviser den ikke fotogenotoksicitet, fotoallergi eller fotocarcinogenicitet, og den er heller ikke beregnet til vurdering af fototoksisk styrke. Testen er endvidere ikke beregnet til at påvise indirekte mekanismer ved fototoksicitet, virkninger af stofskifteprodukter på testmaterialet eller virkninger af blandinger.

Hvor anvendelsen af metaboliserende systemer er et generelt krav til alle in vitro-testninger til forudsigelse af genotoksisk og carcinogent potentiale, er der indtil nu i forbindelse med fototoksikologi kun få tilfælde, hvor der kræves metabolisk transformation for at få det kemiske stof til at reagere som fototoksin in vivo eller in vitro. Det anses derfor hverken som nødvendigt eller videnskabeligt begrundet at gennemføre nærværende testning med et metabolisk aktiverings system.

▼B

1.2. DEFINITIONER

Strålingsintensitet: intensiteten af ultraviolet (UV) eller synligt lys, der falder på en overflade. Intensiteten måles i W/m^2 eller mW/cm^2.

Lysdosis: mængden (= intensitet × tid) af ultraviolet (UV) eller synligt lys, der falder på en overflade, udtrykt i joule (= W × s) pr. overfladeareal, f.eks. J/m^2 eller J/cm^2.

UV-lys, bølgelængdeområder: følgende betegnelser er anbefalet af CIE (Den Internationale Belysningskommission): UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Der anvendes også andre betegnelser. Grænsen mellem UVB og UVA sættes ofte ved 320 nm, og UVA kan inddeles i UV-A1 og UV-A2, hvor grænsen ligger ved ca. 340 nm.

Cellernes levedygtighed: parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation (f.eks. optagelse af det livsvigtige farvestof Neutral Red i cellelysosomer), hvilket, afhængigt af det målte endepunkt og det anvendte testdesign, korrelerer med det samlede celleantal og/eller cellevitaliteten.

Relativ cellelevedygtighed: cellelevedygtighed udtrykt i forhold til negative kontroller (opløsningsmiddel), der har været gennem hele testforløbet (enten +Irr eller –Irr), og som ikke er behandlet med kemiske teststoffer.

PIF (fotoirritationsfaktor): faktor, der beregnes ved sammenligning mellem to lige effektive cytotoksiske koncentrationer (IC_{50}) af det kemiske teststof ved fravær af (–Irr) og ved tilstedeværelse af (+Irr) i en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

IC_{50}: koncentrationen af det kemiske teststof, der reducerer cellelevedygtigheden med 50 %.

MPE (gennemsnitlig lyseffekt): måling, der er afledt af en matematisk analyse af de koncentrationsresponskurver, der fremkommer ved fravær af (–Irr) og ved tilstedeværelse af (+Irr) i en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

Fototoksicitet: akut toksisk respons, der fremkommer efter den første eksponering af huden for visse kemiske stoffer og efterfølgende eksponering for lys, eller som er fremkaldt på samme måde ved hudbestråling efter systemisk indgift af et kemisk stof.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er baseret på en sammenligning mellem cytotoksiciteten af et kemisk stof, når det afprøves med og uden eksponering for en ikke-cytotoksisk dosis af simuleret sollys. Cytotoksicitet er i denne testning udtrykt som en koncentrationsafhængig reduktion af optagelsen af det livsvigtige farvestof Neutral Red som målt 24 timer efter behandling med det kemiske teststof og bestråling (10). NR er et svagt kationisk farvestof, der let gennemtrænger cellemembraner ved ikke-diffusion og akkumuleres intracellulært i lysosomer. Forandringer i overfladen i den sensitive lysosommembran fører til lysosomal ustabilitet og andre forandringer, der gradvist bliver uoprettelige. Den type forandringer, der forårsages af miljøfremmede stoffer, medfører et fald i optagelsen og bindingen af NR. Det er således muligt at skelne mellem levedygtige, beskadigede og døde celler, hvilket er grundlaget for denne test.

▼B

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så der dannes encellede lag. To 96-huls plader for hvert kemisk teststof præinkuberes med otte forskellige koncentrationer af teststoffet i 1 time. Derefter eksponeres den ene af de to plader for den højeste ikke-cytotoksiske strålingsdose, mens den anden plade holdes i mørke. På begge plader erstattes behandlingsmediet derefter af kulturmedium, og efter endnu 24 timers inkubation bestemmes cellelevedygtigheden ved Neutral Red-optagelsen. Cellelevedygtigheden udtrykkes som en procentdel i forhold til ubehandlede kontrolkulturer med opløsningsmiddel og beregnes for hver testkoncentration. For at forudsige det fototoksiske potentiale sammenholdes koncentrationerne for samme respons med og uden stråling, sædvanligvis på IC_{50}-niveau, dvs. den koncentration, der reducerer cellelevedygtigheden til 50 % sammenlignet med de ubehandlede kontroller.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelser**

1.4.1.1. *Celler*

I valideringsundersøgelserne blev der anvendt en permanent muse-fibroblast cellelinje, Balb/c 3T3, klon 31, enten fra American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, eller fra European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Det Forenede Kongerige, og det anbefales derfor at anskaffe materiale fra en velanskrevet cellebank. Hvis der blot kan påvises ækvivalens, kan der anvendes andre celler eller cellelinjer til samme testprocedure, hvis kulturforholdene er tilpasset cellernes specifikke behov.

Celler bør regelmæssigt undersøges for, at de ikke indeholder mycoplasmasmitte, og de bør kun anvendes, hvis de er absolut smittefrie (11).

Det er vigtigt, at cellernes UV-følsomhed undersøges regelmæssigt i henhold til den procedure for kvalitetskontrol, som er beskrevet i denne metode. Eftersom cellers UVA-følsomhed kan stige med antallet af cellegenerationer, bør der anvendes Balb/c 3T3 celler med lavest muligt antal, helst mindre end 100 (se punkt 1.4.2.2.2 og bilag 2).

1.4.1.2. *Medier og dyrkningsbetingelser*

Der bør anvendes korrekte dyrkningsmedie- og inkubationsforhold til rutinemæssige celledyrkninger under testproceduren. For Balb/c 3T3-celler er de korrekte forhold f.eks. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suppleret med 10 % serum fra nyfødte kalve, 4 mM glutamin, penicillin (100 IU), streptomycin (100 g/ml) og inkubation i fugtig atmosfære ved 37 °C, 5-7,5 % CO_2, afhængigt af buffer (se punkt 1.4.1.4, andet afsnit). Der er især vigtigt, at dyrkningsforholdene for cellekulturen tillader en cellecyklustid inden for cellernes eller cellelinjernes normale historiske område.

1.4.1.3. *Forberedelse af kulturerne*

Celler fra nedfrosne kulturer podes i kulturmedier ved passende tæthed og dyrkes i subkultur mindst en gang, inden de anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

▼B

Celler, der anvendes til fototoksicitetstesten, podes i et kulturmedium med passende tæthed, så kulturerne ikke løber sammen ved testens afslutning, dvs. cellelevedygtigheden bestemmes 48 timer efter podning af cellerne. For Balb/c 3T3-celler, der dyrkes på 96-huls plader, er den anbefalede podningstæthed for cellerne 1×10^4 celler pr. hul.

For hver test podes kemikalieceller ensartet i to separate 96-huls plader, der begge sideløbende gennemfører hele testproceduren under identiske kulturforhold med undtagelse af den tid, hvor den ene af pladerne bestråles (+Irr), og den anden holdes i mørke (–Irr).

1.4.1.4. *Forberedelse af teststof*

Teststoffer skal være friske og forberedes umiddelbart inden brug, medmindre data påviser, at de er stabile ved opbevaring. Det anbefales, at enhver form for kemisk håndtering og den indledende behandling af cellerne udføres under lysforhold, der udelukker fotoaktivering eller nedbrydning af teststoffet inden bestråling.

Testkemikalierne skal være opløst i buffer-saltopløsninger, f.eks. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), eller andre fysiologiske buffer-opløsninger, der skal være fri for proteinkomponenter og lysabsorberende komponenter (f.eks. pH-indikatorfarver og vitaminer) for at undgå interferens under bestråling. Da celler under bestråling holdes uden for CO_2-inkubatoren i ca. 50 minutter, skal man være særligt påpasselig for at undgå alkalisering. Hvis der anvendes svage buffere som f.eks. EBSS, kan alkalisering undgås ved at inkubere cellerne ved 7,5 % CO_2. Hvis cellerne inkuberes ved kun 5 % CO_2, skal der vælges en stærkere buffer.

Testkemikalier med begrænset opløselighed i vand skal opløses i et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, skal det forefindes i et konstant volumen i alle kulturer, dvs. i de negative (opløsningsmiddel)kontroller og i alle koncentrationer af testkemikaliet, og det skal være ikke-cytotoksisk ved den pågældende koncentration. Der skal vælges en sådan koncentration af testkemikaliet, at man undgår udfældning og uklare opløsninger.

Dimethylsulfoxid (DMSO) og ethanol (EtOH) er de anbefalede opløsningsmidler. Andre opløsningsmidler med lav cytotoksicitet kan også være velegnede. Inden brug skal alle opløsningsmidler vurderes for specifikke egenskaber f.eks. reaktion med testkemikaliet, quenching af den fototoksiske effekt, evne til at opfange radikaler og/eller kemisk stabilitet i opløsningen.

Vortexblanding og/eller ultralydbehandling og/eller opvarmning til passende temperaturer kan anvendes for at fremme opløsningen, medmindre dette kan påvirke testkemikaliets stabilitet.

▼B

1.4.1.5. *Betingelser for bestråling*

1.4.1.5.1. Lyskilde

Valg af den rette lyskilde og filtre er en afgørende faktor i fototoksicitetstestning. Lys i UVA-området og det synlige område forbindes almindeligvis med fototoksiske reaktioner in vivo (3)(12), hvorimod UVB ofte er mindre relevant, men kraftigt cytotoksisk. Cytotoksiciteten stiger 1 000 gange, når bølgelængden går fra 313 til 280 nm (13). Kriterierne for valg af passende lyskilde skal bl.a. omfatte krav om, at lyskilden udsender bølgelængder, der absorberes af testkemikaliet (absorptionsspektrum), og at lysmængden (der kan opnås inden for en acceptabel eksponeringstid) skal være tilstrækkelig til bestemmelse af kendte fotocytotoksiske kemiske stoffer. Endvidere skal bølgelængder og de anvendte doser ikke påføre testsystemet unødige skader, f.eks. som følge af varmestråling (det infrarøde område).

Simulering af sollys med solsimulatorer anses for at være den optimale kunstlyskilde. Fordelingen af bestråling s styrken i den filtrerede solsimulator skal ligge tæt på fordelingen i udendørs dagslys, som det fremgår af (14). Både xenonlysbuer og (doterede) kviksølvmetalhalogenidlysbuer anvendes som solsimulatorer (15). Sidstnævnte har den fordel, at de udsender mindre varme og er billigere, men ligheden med sollys er knap så perfekt som xenonlysbuernes. Eftersom alle solsimulatorer udsender væsentlige mængder UVB, skal de være behørigt filtrerede for at dæmpe de stærkt cytotoksiske UVB-bølgelængder. Da plastmaterialer til cellekulturer indeholder UV-stabilisatorer, skal spektret måles gennem den samme type 96-huls pladelåg, som anvendes ved testningen. Uanset hvilke forholdsregler der er taget for at dæmpe dele af spektret ved filtrering eller som følge af uundgåelige filtereffekter fra udstyret, må det spektrum, der måles på under disse filtre, ikke afvige fra standard udendørs dagslys (14). Et eksempel på den spektrale strålingsintensitetsfordeling i den filtrerede solsimulator, der anvendes i valideringsundersøgelsen i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, fremgår af (8)(16). Se også bilag 2, figur 1.

1.4.1.5.2. Dosimetri

Lysintensiteten kontrolleres regelmæssigt før hver fototoksicitetstest ved hjælp af et bredbåndet UV-meter. Intensiteten måles gennem den samme type 96-huls pladelåg, som anvendes ved testen. UV-meteret skal være kalibreret til kilden. UV-meterets ydelse kontrolleres, og til dette formål anbefales det at anvende et ekstra UV-meter af samme type og med samme kalibrering som reference. Det optimale ville være, med lidt længere mellemrum, at anvende et spektroradiometer til måling af den spektrale intensitet af den filtrerede lyskilde og til kontrol af kalibreringen af det bredbåndede UV-meter.

En dosis på 5 J/cm^2 (målt i UVA-området) er blevet bestemt til at være ikke-cytotoksisk for Balb/c 3T3-celler og tilstrækkelig kraftig til at få kemiske stoffer til at udløse fototoksiske reaktioner (6) (17). For at nå op på 5 J/cm^2 inden for en periode på 50 min blev intensiteten f.eks. justeret til 1,7 mW/cm^2. Se bilag 2, figur 2. Hvis der anvendes en anden cellelinje eller en anden lyskilde, skal strålingsdosen eventuelt kalibreres, så der vælges en dosering, der ikke er skadelig for cellerne, men samtidig tilstrækkelig til at udløse standardfototoksiner. Lyseksponeringens varighed beregnes på følgende måde:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestrålinsgdosis } (J/cm^2) \times 1000}{\text{strålingsitensitet } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1J = 1 \text{ Wsek})$$

1.4.2. **Forsøgsbetingelser**

1.4.2.1. *Teststoffets koncentrationer*

Koncentrationsområdet for et kemisk stof, der testes henholdsvis med (+Irr) og uden (–Irr) lys, skal nøje fastlægges ud fra eksperimenter til bestemmelse af dosisområde. Det kan være nyttigt at vurdere opløseligheden fra starten og ved 60 min (eller ved den behandlingstid, der skal anvendes), idet opløseligheden kan ændre sig efterhånden eller i løbet af eksponeringstiden. For at undgå toksicitet fremkaldt af forkerte kulturforhold eller af stærkt sure eller alkaliske kemikalier skal pH-værdien i cellekulturer, der er tilsat testkemikalier, ligge i området 6,5 - 7,8.

Den højeste koncentration af teststoffet skal ligge inden for fysiologiske testforhold. F.eks. skal belastende osmotiske og pH-mæssige forhold undgås. Afhængigt af teststof kan det være nødvendigt at overveje andre fysisk-kemiske egenskaber som faktorer til fastlæggelse af den højeste testkoncentration. Med hensyn til relativt opløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer op til mætningspunktet, skal den højest mulige koncentration testes. Generelt skal man undgå udfældning af teststoffet ved enhver testkoncentration. Den maksimale koncentration af et teststof bør ikke overstige 1 000 μg/ml. Osmolalitet bør ikke overstige 10 mM. Der skal anvendes en geometrisk fortyndingsrække bestående af otte teststofkoncentrationer med en konstant fortyndingsfaktor (se punkt 2.1, andet afsnit).

Hvis der findes oplysninger (fra et eksperiment til områdebestemmelse) om, at testkemikaliet ikke er cytotoksisk op til grænsekoncentrationen i mørkeeksperimentet (–Irr), men at det er stærkt cytotoksisk, når det bestråles (+Irr), kan man for at overholde kvalitetskravene til relevante data vøæge andre koncentrationsområder for (+Irr)-eksperimentet end dem, der er valgt for (–Irr)-eksperimentet.

1.4.2.2. *Kontrolkulturer*

1.4.2.2.1. Cellernes strålingsfølsomhed, etablering af historiske data

Celler skal kontrolleres regelmæssigt (ca. ved hver femte cellegeneration) for følsomhed over for lyskilden ved at vurdere deres levedygtighed efter at være eksponeret for stigende doser af bestråling. Til denne vurdering skal der anvendes adskillige bestrålingsdoser og også niveauer, der er væsentligt højere end de værdier, der anvendes ved 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Disse doser kvantificeres lettest ved at måle UV-dele af lyskilden. Celler podes med den tæthed, der er anvendt i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, og bestråles den følgende dag. Cellelevedygtigheden bestemmes en dag senere ud fra Neutral Red-optagelsen. Det skal påvises, at den heraf følgende højeste ikke-cytotoksiske dosis (f.eks. i valideringsundersøgelsen: 5 J/cm^2 [UVA]) var tilstrækkelig til at klassificere referencekemikalierne (tabel 1) korrekt.

▼B

1.4.2.2.2. Strålingsfølsomhed, kontrol af den aktuelle test

Testen overholder kvalitetskriterierne, hvis de bestrålede negative/opløsningsmiddelholdige kontrolkulturer udviser en levedygtighed på mere end 80 % sammenlignet med ikke-bestrålede negative/opløsningsmiddelholdige kontroller.

1.4.2.2.3. Levedygtigheden for kontrolkulturer med opløsningsmiddel

Den absolutte absorbans (optical density) ($OD_{540\ NRU}$) for Neutral Red ekstraheret fra kontrolkulturer med opløsningsmiddel indikerer, om de 1×10^4 celler, der er podet pr. hul, har vokset med normal fordoblingstid i løbet af testens to dage. En testning opfylder de accepterede kriterier, hvis middelværdien af $OD_{540\ NRU}$ for de ubehandlede kontrolkulturer er ≥ 0,4 (dvs. ca. 20 gange baggrundsopløsningsmidlets absorbans).

1.4.2.2.4. Positiv kontrol

Et velkendt fototoksisk kemisk stof skal undersøges sideløbende med hver in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Klorpromazin (CPZ) kan anbefales hertil. For CPZ, der testes ifølge standardprotokollen for in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, er der defineret følgende godkendelseskriterier for afprøvningen: bestrålet CPZ (+Irr): IC_{50} = 0,1 til 2,0 g/ml, ikke-bestrålet CPZ (–Irr): IC_{50} = 7,0 til 90,0 g/ml. Fotoirritationsfaktoren (PIF) skal være > 6. Den positive kontrols historiske ydelse skal overvåges.

Andre fototoksiske kemikalier, der er velegnede i forhold til den kemiske klasse eller opløselighedskarakteristikken af det kemiske stof, der skal evalueres, kan anvendes som sideløbende positiv kontrol i stedet for klorpromazin.

1.4.3. **Testprocedure (6)(7)(8)(16)(17)**

1.4.3.1. *Første dag*

Der anbringes 100 µl kulturmedium i de ydre huller i en 96-huls mikrotiterplade til vævskultur (= negative kontroller). I de øvrige huller tilsættes 100 µl af en cellesuspension med 1×10^5 celler/ml i kulturmedium (= 1×10^4 celler/hul). Der skal klargøres to plader for hver serie af individuelle teststofkoncentrationer samt til opløsningsmiddelkontrollen og den positive kontrol.

Cellerne inkuberes i 24 timer (se punkt 1.4.1.2), indtil de danner et halvt sammenflydende encellet lag. Denne inkubationsperiode tillader cellegendannelse, adhæsion og eksponentiel vækst.

1.4.3.2. *Anden dag*

Efter inkubation dekanteres kulturmediet fra cellerne, som vaskes omhyggeligt med 150 µl af det bufferopløsningsmiddel, der blev anvendt til inkubationen. Der tilsættes 100 µl af bufferen med den korrekte koncentration af teststoffet eller opløsningsmidlet (kontrolkultur med opløsningsmiddel). Der benyttes otte forskellige koncentrationer af teststoffet. Cellerne med teststoffet inkuberes i mørke i 60 minutter (se punkt 1.4.1.2 og punkt 1.4.1.4, andet afsnit).

Blandt de to plader, der er klargjort til hver serie koncentrationer af teststof og kontrolmateriale, udvælges der en tilfældig plade til bestemmelse af cytotoksicitet (–Irr), dvs. kontrolpladen, og desuden en behandlingsplade til bestemmelse af fotocytotoksicitet (+Irr).

▼B

+Irr-eksponeringen gennemføres ved at bestråle cellerne ved stuetemperatur i 50 minutter gennem låget på 96-huls pladen med den størst mulige strålingsdosis, der ikke er cytotoksisk (se også bilag 2). Ikke-bestrålede plader (–Irr) opbevares ved stuetemperatur i en mørk kasse i 50 minutter (= lyseksponeringstiden).

Testopløsningen dekanteres fra, og der vaskes to gange omhyggeligt med 150 µl af den bufferopløsning, der anvendes til inkubation, men som ikke indeholder teststoffet. Bufferen erstattes med kulturmediet, og der inkuberes til næste dag (18-22 timer). Se punkt 1.4.1.2.

1.4.3.3. *Tredjedag:*

1.4.3.3.1 Mikroskopisk evaluering

Med et fasekontrast-mikroskop undersøges cellerne med hensyn til vækst, morfologi og enkeltlagets integritet. Ændringer i cellemorfologi og påvirkninger af cellevækst registreres.

1.4.3.3.2. Test af optagelsen af Neutral Red

Cellerne vaskes med 150 µl forvarmet buffer. Vaskeopløsningen fjernes ved at banke let på pladen. Der tilsættes 100 µl af en 50 µg/ml Neutral Red (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazinhydrochlorid, EINECS nr. 209-035-8; CAS nr. 553-24-2; C.I. 50040) til dyrkningsmediet uden serum (16), og der inkuberes som beskrevet i punkt 1.4.1.2 i tre timer. Efter inkubation fjernes Neutral Red-mediet, og cellerne vaskes med 150 µl buffer. Efter dekantering fjernes overskydende buffer med sugende papir eller ved centrifugering.

Der tilsættes nøjagtig 150 µl Neutral Red-desorptionsopløsning (frisk fremstillet af 49 dele vand + 50 dele ethanol + 1 del eddikesyre).

Mikrotiterpladen rystes forsigtigt på en mikrotiterpladeshaker i 10 minutter, indtil al Neutral Red er ekstraheret fra cellerne, og der er dannet en homogen opløsning.

OD af Neutral Red-ekstraktet måles ved 540 nm i et spektrofotometer med blindprøver som reference. Resultaterne gemmes i et passende filformat med henblik på senere analyse.

2. **DATA**

2.1. DATAKVALITET OG -MÆNGDE

Resultaterne af undersøgelsen skal give mulighed for en relevant analyse af koncentration/respons fremkommet med og uden bestråling og, hvis det er muligt, af den koncentration af kemisk stof, hvor cellelevedygtigheden reduceres til 50 % (IC_{50}). Hvis der påvises cytotoksicitet, skal både koncentrationsområdet og enkeltkoncentrationerne fastsættes på en sådan måde, at der kan tilpasses en kurve til forsøgsdataene.

Hvis resultaterne er enten klart positive eller klart negative (se punkt 2.3, første afsnit), vil første forsøg, der understøttes af et eller flere foreløbige eksperimenter til bestemmelse af dosisområde, være tilstrækkeligt.

▼B

Usikre og tvetydige resultater skal kontrolleres ved at gentage undersøgelsen (se også punkt 2.4, andet afsnit). I disse tilfælde kan det være påkrævet at ændre forsøgsbetingelserne for at opnå et klart resultat. Forsøgsbetingelser, der kan ændres, er bl.a. koncentrationsområde, inkubationstid før bestråling og eksponeringstid. En kortere eksponeringstid kan være relevant for stoffer, der er ustabile i vandig opløsning.

2.2. EVALUERING AF RESULTATERNE

Til evaluering af resultaterne kan der beregnes en fotoirritationsfaktor (PIF) eller en gennemsnitlig lyseffekt (MPE).

Ved beregning af parametrene for fotocytotoksicitet (se nedenfor) skal de spredte koncentration-responsværdier tilnærmes en passende kontinuerlig koncentration-responskurve (model). Kurven tilnærmes normalt til dataene ved hjælp af en ikke-lineær regressionsmetode (18). For at kunne vurdere virkningen af dataafvigelser på den tilpassede kurve anbefales det at gennemføre en bootstrap-proces.

Fotoirritationsfaktoren (PIF) beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Hvis der ikke kan beregnes en IC_{50} med eller uden lys, kan der ikke fastlægges en PIF for testmaterialet. Den gennemsnitlige lyseffekt (MPE) er baseret på en sammenligning af de færdige koncentrationsresponskurver (19). Den defineres som et vægtet gennemsnit af repræsentative sæt af lyseffektværdier:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Lyseffekten PE_C ved en given koncentration C defineres som produktet af responseffekt RE_C og dosiseffekt DE_C dvs. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Responseffekt RE_C er forskellen mellem den konstaterede respons med og uden lys, dvs. $RE_C = R_c$ (–Irr) – R_c (+Irr). Dosiseffekten beregnes ved hjælp af:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

hvor C* repræsenterer ækvivalenskoncentrationen, dvs. den koncentration, hvor et +Irr respons svarer til et –Irr respons ved koncentration C. Hvis C* ikke kan bestemmes, fordi responsværdierne i +Irr kurven systematisk er højere eller lavere end RC (–Irr), sættes dosiseffekten til 1. Vægtningsfaktorerne w_i fremkommer ved den højeste responsværdi, dvs. w_i = MAX {R_i (–Irr), R_i (-Irr) }. Koncentrationstabellen C; udvælges, så der er lige mange punkter i hvert af de koncentrationsintervaller, som de koncentrationsværdier, der anvendes i eksperimentet, afgrænser. Beregningen af MPE er begrænset til den højeste koncentrationsværdi, hvor mindst en af de to kurver udviser en responsværdi på mindst 10 %. Hvis denne højeste koncentration er højere end den højeste koncentration, der er blevet anvendt i +Irr-forsøget, sættes den resterende del af +Irr-kurven til responsværdien »0«. Afhængigt af om MPE-værdien er større end en korrekt udvalgt skæringsværdi (MPE_C = 0,15) eller ej, klassificeres stoffet som fototoksisk.

▼B

En softwarepakke til beregning af PIF og MPE kan bestilles hos (20).

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

På grundlag af valideringsundersøgelsen (8) vil et teststof med en PIF < 2 eller en MPE < 0,1 give resultatet: »ingen fototoksicitet«. En PIF > 2 men < 5 eller en MPE > 0,1 men < 0,15 vil give resultatet: »sandsynlig fototoksicitet«, og en PIF > 5 eller en MPE > 0,15 vil give resultatet: »fototoksicitet«.

Alle laboratorier, der starter brug af denne test op, skal undersøge de referencematerialer, der er opstillet i tabel 1, inden de begynder at teste stoffer for fototoksicitet. PIF- eller MPE-værdier skal ligge tæt op ad værdierne i tabel 1.

Tabel 1

Kemisk betegnelse	EINECS nr.	CAS nr.	PIF	MPE	Absorptionsmaksima	Opløsningsmiddel (1)
Amiodaron HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (skulder)	ethanol
Klorpromazin HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33 - 0,63	309 nm	ethanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34 - 0,90	316 nm	acetonitril
Anthracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19 - 0,81	356 nm	acetonitril
Protoporphyrin IX, dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54 - 0,74	402 nm	ethanol
L-Histidin		[7006-35-1]	ingen PIF	0,05 - 0,10	211 nm	vand
Hexachlorophen	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317 nm (skulder)	ethanol
Natriumlaurylsulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	ingen absorption	vand

(1) Opløsningsmiddel anvendt til måling af absorption.

2.4. FORTOLKNING AF DATA

Hvis der kun kan konstateres fototoksiske virkninger ved den højeste testkoncentration (specielt i forbindelse med vandopløselige teststoffer), skal der indgå andre overvejelser i risikovurderingen. Det kan f.eks. være data om hudabsorption og ophobning af det kemiske stof i huden og/eller data fra andre test, f.eks. test af det kemiske stof in vitro i dyrehud eller human hud eller hudmodeller.

▼B

Hvis der ikke påvises nogen toksicitet (+Irr og –Irr), og hvis dårlig opløselighed har begrænset de mulige koncentrationer, kan man betvivle testens egnethed til det pågældende stof, og der bør gennemføres bekræftende undersøgelser baseret på en anden model.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— identifikationsdata, trivialnavne, generiske navne og IUPAC- og CAS-nummer, hvis kendt

— fysiske egenskaber og renhedsgrad

— fysiske-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen

— absorptionsspektrum for UV/synligt lys

— stabilitet og foto stabilitet, hvis kendt.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— teststoffets opløselighed i opløsningsmidlet

— mængden (i procent) af opløsningsmiddel i kulturmediet.

Celler:

— celletype og oprindelse

— fravær af mycoplasma

— antal cellegenerationer, hvis kendt

— cellernes strålingsfølsomhed målt med det strålingsudstyr, der anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

Testbetingelser (1) ved *inkubation før og efter eksponering for kemikaliet:*

— type og sammensætning af dyrkningsmedium

— omstændigheder ved inkubationen ($C0_2$-koncentration, temperatur, fugtighed)

— varighed af inkubationen (før og efter eksponeringen for kemikaliet).

Testbetingelser (2) *ved eksponering for kemikaliet:*

— begrundelse for valg af koncentrationer af teststoffet både med og uden bestråling

— hvis stoffet er tungtopløseligt, og cytotoksicitet ikke er påvist: begrundelse for den største koncentration, der er anvendt ved undersøgelsen

— type og sammensætning af dyrkningsmedium (buffer-saltopløsning)

— varigheden af eksponering for det kemiske stof.

Testbetingelser (3) *ved bestråling:*

— begrundelse for valg af lyskilde

▼B

— producent og type af lyskilde og radiometer

— lyskildens spektrale strålingskarakteristik

— det anvendte filters transmissions-/absorptionskarakteristik

— det anvendte radio meters karakteristik og detaljeret beskrivelse af dets kalibrering

— afstanden mellem lyskilden og testsystemet

— UVA-strålingsintensiteten (irradians) for den pågældende afstand udtrykt i mW/cm^2

— varigheden af udsættelsen for UV/synligt lys

— UVA-dosis (strålingsintensitet × tid) udtrykt i J/cm^2

— temperaturen i cellekulturen under bestråling og den tilsvarende cellekultur, der samtidig opbevares i mørke.

Testbetingelser (4) ved *Neutral Red-levedygtighedstest:*

— sammensætning af Neutral Red-mediet

— varigheden af inkubationen med Neutral Red

— omstændigheder ved inkubationen ($C0_2$-koncentration, temperatur, fugtighed)

— omstændigheder ved ekstraktion af Neutral Red (ekstraktionsmiddel, varighed)

— bølgelængde anvendt ved den spektrofotometriske aflæsning af OD for Neutral Red

— eventuel sekundær bølgelængde (reference)

— indhold af spektrofotometers eventuelle negative kontroller.

Resultater:

— cellelevedygtighed for hver koncentration af teststoffet udtrykt som en procentdel af levedygtigheden i kontrolkulturerne

— koncentrations-/responskurver (koncentration af teststoffet over for den relative cellelevedygtighed) fremkommet i samhørende +Irr og –Irr eksperimenter

— analyse af data af koncentrations-/responskurverne: hvis muligt beregning/kalkulation af IC_{50} (+Irr) og IC_{50} (–Irr)

— sammenligning af de to koncentrations-/responskurver, som er fremkommet med og uden bestråling, enten ved beregning af fotoirritationsfaktor (PIF) eller ved beregning af den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)

— kriterier for accept af test, samtidig negativ kontrol

— absolut levedygtighed (OD af Neutral Red-ekstrakt) for bestrålede og ikke-bestrålede celler

— forklarende data for den negative kontrol, gennemsnit og standardafvigelse

— kriterier for accept af test, samtidig positiv kontrol

▼B

— IC50(+Irr) og IC_{50} (–Irr) og PIF/MPE for den positive kontrols kemiske stof

— forklarende data for den positive kontrols kemiske stof: IC_{50} (+Irr) og IC_{50} (–Irr) og PIF/MPE, gennemsnit og standardafvigelse.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In »Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry« Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In »The science of Photobiology« Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 »Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water« Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Doring, B., Holzhiitter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhutter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA/n *vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30^{th}-31^{th} October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15^{th} March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett, 24, 119-124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In »Dermatotoxicology«, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographie colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

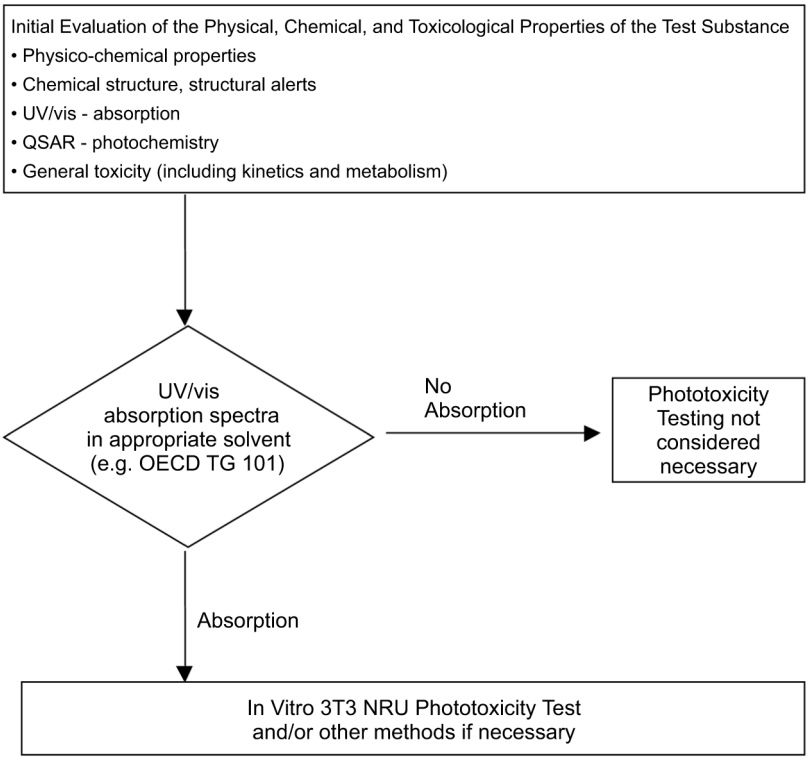
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

BILAG 1

3T3 NRU PT's rolle i forhold til de forskellige trin i fototoksicitetstest af kemikalier

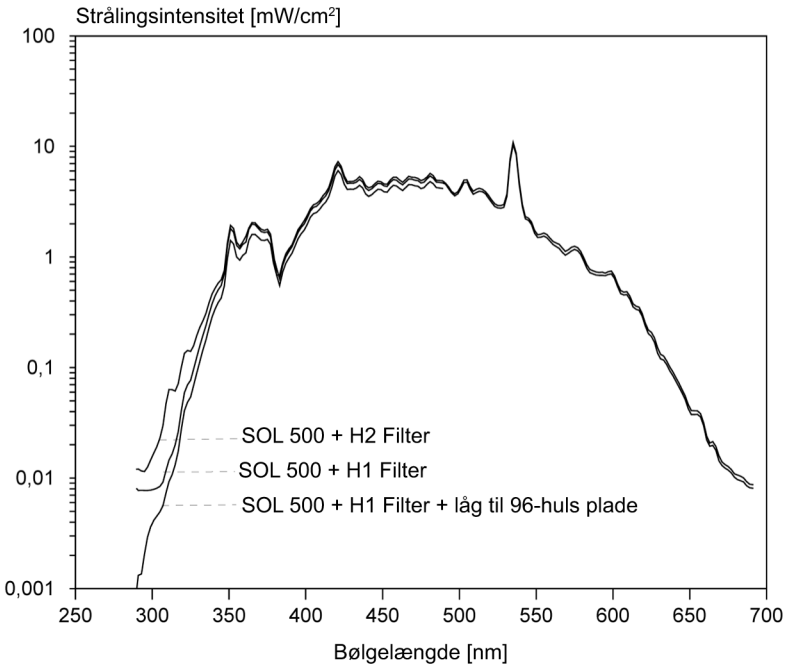


▼B

BILAG 2

Figur 1

Spektraleffektfordeling i en filtreret solsimulator



(Se punkt 1.4.1.5, andet afsnit)

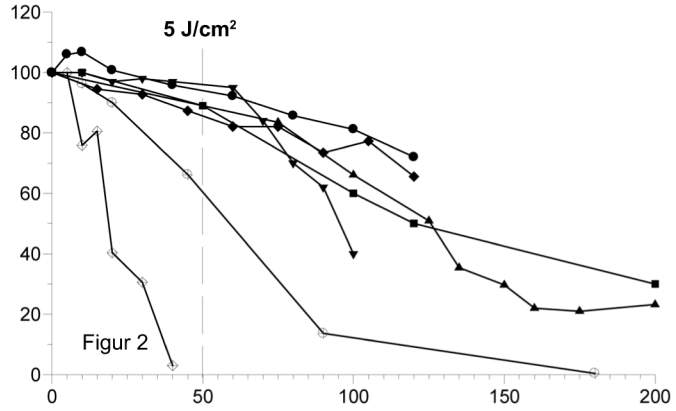
Figur 1 viser et eksempel på en acceptabel spektralintensitetsfordeling i en filtreret solsimulator. Målingerne er fra den doterede metalhalogenidkilde, der anvendes i valideringstesten i 3T3 NRU PT (6)(8)(17). Kurverne viser to forskellige filtres virkning og den supplerende filtereffekt af låget på en 96-huls cellekulturplade. H2-filter blev kun anvendt i forbindelse med testsystemer, der tolererer en større mængde UVB (test med hudmodel og fotohæmolysetest af røde blodlegemer). I 3T3 NRU-PT blev H1-filteret anvendt. Af figuren fremgår, at supplerende filtreringseffekt fra pladelåget hovedsagelig konstateres i UVB-området, hvor det tillader tilstrækkeligt UVB i bestrålingsspektret til at excitere kemikalier, der typisk absorberer i UVB-området, som f.eks. Amiodaron (se tabel 1).

▼B

Figur 2

Balb/c 3T3-cellers bestrålingsfølsomhed (målt i UVA-området)

Cellelevedygtighed (% Neutral Red-optagelse i mørkekontroller)



(se punkt 1.4.1.5.2, andet afsnit, samt punkt 1.4.2.2.1 og 1.4.2.2.2)

Balb/c 3T3-cellers følsomhed for bestråling med solsimulatoren under valideringstesten af 3T3 NRU-fototoksicitetstesten målt i UVA-området. Figuren viser de resultater, man kom frem til i syv forskellige laboratorier forud for valideringsundersøgelsen (1). De to kurver med åbne symboler repræsenterer gamle celler (stort antal cellegenerationer), der måtte udskiftes med nye celler, og kurverne med udfyldte symboler viser celler med acceptabel bestrålingstolerance.

På baggrund af disse data blev den højeste ikke-cytotoksiske bestrålingsdosis på 5 J/cm^2 fastlagt (lodrette stiplede linje). Den vandrette stiplede linje viser den maksimale acceptable bestrålingseffekt, der omtales i punkt 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder baseret på denne vejledning bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429, kapitel B.42 i dette bilag), er allerede blevet vedtaget (1). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Den ajourførte LLNA er baseret på en evaluering af erfaringerne og videnskabelige data (12). Der er tale om endnu en TM til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I den anden TM (dvs. OECD Test Guideline 406, kapitel B.6 i dette bilag) anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehlertesten (13). LLNA har visse fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (13), hvad angår dyrevelfærd. Denne ajourførte LLNA-TM rummer et sæt ydeevnestandarder (tillæg 1) til brug for vurdering af valideringsstatus for nye og/eller modificerede testmetoder, som funktionelt og mekanisk svarer til LLNA, i overensstemmelse med principperne i OECD Guidance Document No. 34 (14).

2. LLNA består i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Det skal bemærkes, at de let til moderat sensibiliserende stoffer, der anbefales som velegnede positive kontrolstoffer (PC) ved marsvineforsøg (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) også er egnede til brug i forbindelse med LLNA (6) (8) (15). En reduceret version af LLNA (rLLNA), hvor der anvendes op til 40 % færre dyr, er også beskrevet som en mulighed i denne TM (16) (17) (18). rLLNA kan anvendes, når det er lovgivningsmæssigt nødvendigt at bekræfte en negativ forudsigelse af et potentielt hudsensibiliserende stof, forudsat at alle andre LLNA-protokolspecifikationer overholdes som beskrevet i denne TM. En forudsigelse af et negativt resultat bør være baseret på alle foreliggende oplysninger som beskrevet i punkt 4. Inden anvendelsen af rLLNA-metoden skal der fremlægges klare begrundelser og et klart videnskabeligt rationale derfor. Hvis der imod forventning opnås et positivt eller tvetydigt resultat i rLLNA, kan det være nødvendigt at foretage yderligere forsøg for at fortolke eller uddybe resultatet. rLLNA bør ikke anvendes til fareidentifikation af hudsensibiliserende teststoffer, når der er brug for oplysninger om dosis-responsforholdet såsom underinddeling i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og FN's globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier.

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 2.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA er en alternativ metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier. Dette indebærer ikke, at LLNA i alle tilfælde bør benyttes i stedet for marsvinetesten (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ,

▼M3

for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse. Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i betragtning ved vurderingen af, om LLNA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA — se punkt 5) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske det nødvendige antal dyr til dette formål. Desuden repræsenterer LLNA en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på. LLNA er baseret på immunologiske hændelser, som udløses af kemikalier i induktionsfasen af sensibiliseringen. I modsætning til marsvinetest, (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) kræver LLNA ikke, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. Desuden kræver LLNA ikke anvendelse af et adjuvans, således som det er tilfældet for maksimeringstesten på marsvin (13). LLNA mindsker således dyrenes lidelser. Trods LLNA's fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 må man have for øje, at metoden har visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige (13) (f.eks. falsk negative resultater i LLNA for visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (19) (20) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (21), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13). I lyset af den begrænsede valideringsdatabase primært bestående af pesticidformuleringer er der endvidere større sandsynlighed for, at LLNA giver et positivt resultat i forbindelse med disse typer teststoffer (22) i forhold til marsvinetesten. I forbindelse med testning af formuleringer kan man imidlertid overveje at inkludere lignende stoffer med kendte resultater som referencestoffer for at påvise, at LLNA fungerer korrekt (se punkt 16). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA kunne anvendes til testning af alle stoffer, medmindre disse stoffer har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA-metodens nøjagtighed.

TESTPRINCIPPET

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst tre, før teststoffet kan klassificeres som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af in vivo radioaktiv mærkning til måling af øget celleproliferation i de drænende aurikulære lymfeknuder. Andre endepunkter til bedømmelse af antallet af celler under formering kan imidlertid anvendes, forudsat af ydeevnestandarderne opfyldes fuldt ud (tillæg 1).

▼M3

BESKRIVELSE AF ASSAYET

Valg af dyreart

7. Mus må foretrækkes til denne test. Der anvendes unge voksne hunmus af stamme CBA/Ca eller CBA/J, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i LLNA-respons.

Miljøbetingelser og fodring

8. Mus bør anbringes i grupper (23), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

Forberedelse af dyrene

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

Fremstilling af forsøgsopløsninger

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Pålidelighedskontrol

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed som et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. Det anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 3 større end i den negative kontrolgruppe. PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 20 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 101-86-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v) og 5 % mercaptobenzothiazol (CAS nr. 149-30-4) i *N,N*-dimethylformamid (se

▼M3

tillæg 1, tabel 1). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA (dvs. udfører LLNA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en procedureændring af LLNA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (12).

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (24). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type teststoffers potentiale for hudsensibilisering korrekt. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

▼M3

TESTPROCEDURE

Antal dyr og dosisniveauer

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-14). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning (3) og (5). Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (3) (25). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (19), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 35). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppen, når der indsamles data for de enkelte dyr (12). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Nogle tilsynsmyndigheder accepterer imidlertid poolede data, og i disse tilfælde kan brugerne vælge at indsamle data for de enkelte dyr eller poolede data.

Prescreening

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

▼M3

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 6). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (25). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis) og på dag 6. På dag 6 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på ≥ 3 og/eller en forøgelse af øretykkelsen på ≥ 25 % på måledagen (26) (27). Den højeste dosis i LLNA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

Tabel 1

Erytemscorer

Observation	Score
Intet erytem	0
Meget let erytem (knapt diagnosticerbart)	1
Veldefineret erytem	2
Moderat til svært erytem	3
Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet	4

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (26) (27) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (30) (32) (33) (34).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (35) (36), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA-hovedundersøgelsen: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 6 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (37).

▼M3

Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15)

— *Dag 2 og 3:* Påføringen fra dag 1 gentages.

— *Dag 4 og 5:* Ingen behandling.

— *Dag 6:* Hvert dyrs vægt registreres. 250 µl sterilt phosphatbufferet saltopløsning (PBS) indeholdende 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritieret (^{3}H)-methylthymidin injiceres i alle testdyr og kontroldyr gennem halevenen. Alternativt injiceres 250 µL sterilt phosphatbufferet saltopløsning (PBS) indeholdende 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-iododeoxyuridin og 10^{-5}M fluordeoxyuridin i alle dyr gennem halevenen. Fem timer (5 t) senere aflives dyrene. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og pooles i PBS for hvert dyr (enkeltdyrsmetode). Alternativt eksciseres og pooles lymfeknuderne fra hvert øre i PBS for hver behandlingsgruppe (metode med poolet behandlingsgruppe). Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (12). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

Fremstilling af cellesuspensioner

26. En enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC), eksciseret bilateralt ved hjælp af enkeltdyrsmetoden eller alternativt ved hjælp af metoden med poolet behandlingsgruppe, fremstilles ved forsigtig mekanisk disaggregering gennem 200 µm trådnet af rustfrit stål eller en anden acceptabel teknik til fremstilling af en enkeltcellesuspension. Lymfeknudecellerne vaskes to gange med overskud af saltvand med phosphatbuffer, og dna fældes med 5 % trichloreddikesyre (TCA) ved 4 °C i 18 timer (3). De dannede pellets genopslæmmes enten i 1 ml TCA og overføres til scintillationsglas indeholdende 10 ml scintillatorvæske til ^{3}H-tælling, eller overføres direkte i gammatælleglas til tælling af ^{125}I.

Bestemmelse af celleproliferationen (optagen radioaktivitet)

27. Optagelsen af ^{3}H-methylthymidin måles ved β-scintillationstælling som antal disintegrationer pr. minut (DPM). Optagelsen af ^{125}I-ioddeoxyuridin måles ved ^{125}I-tælling og angives også som DPM. Afhængigt af den valgte metode angives optagelsen som DPM/dyr (individuel metode) eller DPM/behandlingsgruppe (poolet metode).

Reduceret LLNA

28. I visse situationer, når det er lovgivningsmæssigt nødvendigt at bekræfte en negativ forudsigelse af et potentielt hudsensibiliserende stof, kan der anvendes en frivillig rLLNA-protokol (16) (17) (18), hvor der anvendes færre dyr, forudsat at alle andre LLNA-protokolspecifikationer overholdes som beskrevet i denne TM. Inden anvendelsen af rLLNA-metoden skal der fremlægges klare begrundelser og et klart videnskabeligt rationale derfor. Hvis der opnås et positivt eller tvetydigt resultat, kan det være nødvendigt at foretage yderligere forsøg for at fortolke eller uddybe resultatet.

▼M3

29. Det reducerede antal dosisgrupper er den eneste forskel mellem LLNA- og rLLNA-testprotokollerne, og rLLNA tilvejebringer derfor ikke oplysninger om dosis-responsforholdet. rLLNA bør derfor ikke anvendes, når der er behov for oplysninger om dosis-responsforholdet. Som ved flerdosis-LLNA skal den teststofkoncentration, der evalueres i rLLNA, være den maksimale koncentration, som ikke inducerer åbenbar systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen (se punkt 18).

OBSERVATIONER

Kliniske observationer

30. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (37).

Kropsvægt

31. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

32. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som stimulationsindeks (SI). Ved enkeltdyrsmetoden fås SI-værdien ved at dividere den gennemsnitlige DPM/dyr fra hver stoftestgruppe og PC-gruppen med den gennemsnitlige DPM/mus fra opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1. Ved metoden med poolet behandlingsgruppe fås SI ved division af den poolede optagelse af radioaktivitet for hver behandlingsgruppe med den poolede optagelse for VC-gruppen. Resultatet er den gennemsnitlige SI-værdi.

33. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 3. Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat anses for at være positivt (4) (5) (6).

34. Hvis det er nødvendigt at uddybe de opnåede resultater, bør teststoffets forskellige egenskaber tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (7).

35. Indsamling af data om radioaktivitet for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende VC-gruppe). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

▼M3

DATA OG RAPPORTERING

Data

36. Data opstilles i tabelform. Ved enkeltdyrsmetoden angives de individuelle DPM-værdier, gruppens gennemsnitlige DPM/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende VC-gruppe. Ved metoden med poolet behandlingsgruppe vises den gennemsnitlige/mediane DPM og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende VC-gruppe.

Testrapport

37. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse).

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

▼M3

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— en tabel med individuelle (enkeltdyrsmetode) eller gennemsnitlige/mediane (metode med poolet behandlingsgruppe) DPM-værdier og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for DPM/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe ved enkeltdyrsmetoden

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne ved enkeltdyrsmetoden

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Tillæg 1

Ydeevnestandarder til brug for vurdering af foreslåede lignende eller modificerede LLNA-testmetoder til bedømmelse af hudsensibilisering

INDLEDNING

1. Formålet med ydeevnestandarder er at fastslå grundlaget for bedømmelsen af nye testmetoder, både beskyttede (dvs. ophavsretsbeskyttede, varemærkebeskyttede og registrerede) og ikkebeskyttede, som værende tilstrækkelig nøjagtige og pålidelige til bestemte testformål. Disse ydeevnestandarder for validerede og anerkendte testmetoder kan anvendes til at evaluere pålideligheden og nøjagtigheden af andre lignende metoder (i daglig tale »me-too«-test), som er baseret på lignende videnskabelige principper, og til at måle eller forudsige den samme biologiske eller toksiske effekt (14).

2. Inden indførelsen af modificerede metoder (dvs. foreslåede potentielle forbedringer af en godkendt testmetode) skal der foretages en bedømmelse af de foreslåede ændringers effekt på testresultatet og af, i hvilket omfang disse ændringer berører de oplysninger, der er tilgængelige for de øvrige dele i valideringsprocessen. Afhængigt af antallet og arten af de foreslåede ændringer, de genererede data og støttedokumentation for disse ændringer, skal de enten underkastes den samme valideringsproces som beskrevet for en ny test eller, hvis det er hensigtsmæssigt, en begrænset vurdering af pålideligheden og relevansen på grundlag af anerkendte ydeevnestandarder (14).

3. Lignende eller modificerede metoder, der foreslås anvendt i forbindelse med denne TM, skal vurderes med hensyn til pålidelighed og nøjagtighed ved hjælp af kemikalier, der repræsenterer hele LLNA-pointskalaen. For at undgå unødvendig brug af dyr opfordres metodeudviklere på det kraftigste til at rådføre sig med de kompetente myndigheder inden iværksættelsen af valideringsundersøgelser i overensstemmelse med ydeevnestandarderne og vejledningen i denne TM.

4. Disse harmoniserede ydeevnestandarder er baseret på de harmoniserede ydeevnestandarder US-ICCVAM, EU-ECVAM og japanske JaCVAM (12) for vurdering af validiteten af lignende eller modificerede versioner af LLNA. Ydeevnestandarderne indeholder de centrale dele af testmetoden, anbefalede referencekemikalier og standarder for nøjagtighed og pålidelighed, som den foreslåede metode som minimum skal opfylde.

I. **Centrale dele af testmetoden**

5. For at sikre, at en lignende eller modificeret LLNA-metode funktionelt og mekanisk svarer til LLNA og måler den samme biologiske effekt, skal følgende dele inkluderes i testprotokollen:

— Teststoffet skal påføres begge musens ører.

— Lymfocytproliferationen måles i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet.

— Lymfocytproliferationen måles i induktionsfasen i hudsensibilisering.

▼M3

— For teststoffer skal den højeste dosis være den maksimale koncentration, som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen. For positive referencekemikalier skal den højeste dosis være mindst lige så høj som de tilsvarende referencekemikaliers EC3-værdier i LLNA (se tabel 1) uden at inducere systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen.

— Alle undersøgelser skal omfatte en sideløbende vehikelkontrol, og når det er relevant, foretages der også en sideløbende positiv kontrol.

— Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe.

— Der indsamles data for de enkelte dyr eller poolede data.

Hvis nogle af disse kriterier ikke opfyldes, kan disse ydeevnestandarder ikke anvendes til validering af den lignende eller modificerede metode.

II. **Minimumsliste over referencekemikalier**

6. I de harmoniserede ydeevnestandarder US-ICCVAM, EU-ECVAM og japanske JaCVAM (12) er der blevet identificeret 18 referencekemikalier, der som minimum skal anvendes, og fire valgfrie referencekemikalier (dvs. stoffer, der gav enten falsk positive eller falsk negative resultater i LLNA sammenholdt med resultaterne af forsøg med mennesker og marsvin (B.6 eller OECD Test Guideline 406) (13), og således gør det muligt at påvise en tilsvarende eller bedre ydeevne end LLNA), som er inkluderet i LLNA-ydeevnestandarderne. Kriterierne for udvælgelse af disse kemikalier var:

— Listen over referencekemikalier indeholdt den type stoffer, der typisk testes for potentiale for hudsensibilisering, og det responsområde, som kan måles eller forudsiges i LLNA.

— Stofferne havde veldefinerede kemiske strukturer.

— LLNA-data fra marsvinetest, (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) og (hvis muligt) data for mennesker var tilgængelige for hvert stof.

— Stofferne var gængse.

De anbefalede referencekemikalier er angivet i tabel 1. Studier baseret på de anbefalede referencekemikalier evalueres i det vehikel, som er angivet i tabel 1. Hvis et stof på listen ikke kan fås, kan der benyttes andre stoffer, som opfylder de nævnte udvælgelseskriterier, hvis der gives tilstrækkelig begrundelse.

▼M3

Tabel 1

Anbefalede referencekemikalier for LLNA-ydeevnestandarderne

Antal	Kemikalier (1)	CAS-nr.	Form	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	EC3-interval	LLNA vs. marsvin	LLNA vs. human
1	5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Fly.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	IB	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Fast	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-phenylendiamin	106-50-3	Fast	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cobaltchlorid	7646-79-9	Fast	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Fly.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast	DMF	1,7	1	0,85-3,4	IB	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Fly.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	Hexachloraceton	101-86-0	Fly.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Fly.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Phenylbenzoat	93-99-2	Fast	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Kanelalkohol	104-54-1	Fast	AOO	21	1	10,5-42	IB	+/+	+/+
12	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Fast	DMF	24	1	12-48	IB	+/+	+/+
13	Methylmethacrylat	80-62-6	Fly.	AOO	90	1	45-100	IB	+/+	+/+
14	Chlorbenzen	108-90-7	Fly.	AOO	25	1	Ikke relevant	Ikke relevant	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Fly.	AOO	50	1	Ikke relevant	Ikke relevant	–/–	–/+

▼M3

Antal	Kemikalier (1)	CAS-nr.	Form	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	EC3-interval	LLNA vs. marsvin	LLNA vs. human
16	Mælkesyre	50-21-5	Fly.	DMSO	25	1	Ikke relevant	Ikke relevant	–/–	–/ (*)
17	Methylsalicylat	119-36-8	Fly.	AOO	20	9	Ikke relevant	Ikke relevant	–/–	–/–
18	Salicylsyre	69-72-7	Fast	AOO	25	1	Ikke relevant	Ikke relevant	–/–	–/–
Frivillige stoffer til påvisning af forbedret ydeevne i forhold til LLNA										
19	Natriumlaurylsulfat	151-21-3	Fast	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Fly	MEK	28	1	14-56	IB	+/–	+/+
21	Xylen	1330-20-7	Fly	AOO	95,8	1	47,9-100	IB	+/ (**)	+/–
22	Nikkelchlorid	7718-54-9	Fast	DMSO	5	2	Ikke relevant	Ikke relevant	–/+	–/+

Forkortelser: AOO = acetone: olivenolie (4:1, v/v); CAS-nr. = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimethylformamid; DMSO = dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzen; EC3 = den estimerede koncentration, der skal til for at fremkalde en tre gange stigning i stimulationsindekset; Marsvin = marsvinetestresultat (dvs. B.6 eller OECD Test Guideline 406) (13); HCA = hexylkanelaldehyd; Fly = flydende; LLNA = resultat af assay på lokale lymfeknuder i mus (dvs. B.42 eller OECD Test Guideline 429) (1); MEK = methylethylketon; NA = ikke relevant, da stimulationsindekset er < 3; IB = ikke beregnet, da data hidrører fra en enkelt undersøgelse; Fast = faste; Veh = testvehikel.

(*) Antages ikke at være et sensibiliserende stof for mennesker, da der ikke blev fundet nogen kliniske lappetestresultater, det er ikke inkluderet som et lappetestkit til påvisning af allergi, og der blev ikke fundet nogen caserapporter om human sensibilisering.

(**) Der foreligger ingen data fra marsvinetest.

(1) Kemikalier fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

(2) Som følge af den potentielle indvirkning af forskellige vehikler på LLNA's ydeevne bør det anbefalede vehikel for hvert referencekemikalie anvendes (24) (32).

(3) Middelværdi, hvor der var mere end en EC3-værdi. For negative stoffer (dvs. med stimulationsindeks < 3) angives den højeste testede koncentration.

(4) Antal LLNA-undersøgelser, som dataene hidrører fra.

(5) Forhandles under betegnelsen Kathon CG (CAS-nr. 55965-84-9), der er en blanding af CMI og MI i forholdet 1:3. De relative koncentrationer af hver komponent ligger i intervallet 1,1 % til 1,25 % (CMI) og 0,3 % til 0,45 % (MI). De inaktive komponenter er magnesiumsalte (21,5 % til 24 %) og kobbernitrat (0,15 % til 0,17 %), og resten af formuleringen er 74 % til 77 % vand. Kathon CG forhandles allerede gennem Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (nu Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Fastlagte standarder for nøjagtighed og pålidelighed**

7. Nøjagtigheden af en lignende eller modificeret LLNA-metode skal som minimum være den samme som for LLNA-ydeevnestandarderne, når den vurderes på grundlag af de 18 referencekemikalier, der som minimum skal anvendes. Den nye eller modificerede metode skal resultere i en korrekt klassificering baseret på en »ja/nej«-afgørelse. Alle de referencekemikalier, der som minimum skal anvendes, klassificeres ikke altid korrekt ved den nye eller modificerede metode. Hvis et af de milde sensibiliserende stoffer f.eks. blev klassificeret forkert, kan en begrundelse for fejlklassificeringen og relevante supplerende data (f.eks. testresultater med korrekte klassificeringer af andre stoffer med samme fysiske, kemiske og sensibiliserende egenskaber som det fejlklassificerede referencekemikalie) anses som dokumentation for samme ydeevne. I så fald vurderes valideringsstatus for den nye eller modificerede LLNA-testmetode fra sag til sag.

Reproducerbarhed inden for laboratorier

8. Ved bestemmelse af reproducerbarheden inden for laboratorier skal en ny eller modificeret LLNA-metode vurderes ved hjælp af et sensibiliserende stof, som er velkarakteriseret i LLNA. LLNA-ydeevnestandarderne er således baseret på de variable resultater af gentagne test af hexylkanelaldehyd (HCA). Ved vurdering af pålideligheden inden for laboratorier skal de beregnede koncentrationstærskelværdier (ECt-værdier) for HCA udledes fire gange med mindst en uges mellemrum mellem forsøgene. Reproducerbarheden inden for laboratorier er acceptabel, hvis laboratoriet i hver HCA-test kan opnå ECt-værdier på mellem 5 % og 20 %, hvilket udgør 0,5-2 gange den EC3-middelværdi, der er specificeret for HCA (10 %) i LLNA (se tabel 1).

Reproducerbarhed mellem laboratorier

9. Ved bedømmelsen af reproducerbarheden mellem laboratorier skal en ny eller modificeret LLNA-metode vurderes ved hjælp af to sensibiliserende stoffer, som er velkarakteriserede i LLNA. LLNA-ydeevnestandarderne er baseret på de variable resultater af HCA- og 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)-test i forskellige laboratorier. ECt-værdierne afledes uafhængigt af en enkelt undersøgelse udført i mindst tre forskellige laboratorier. For at påvise, at reproducerbarheden mellem laboratorier er acceptabel, skal det enkelte laboratorium opnå ECt-værdier på 5 %-20 % og 0,025 %-0,1 % for DNCB, hvilket udgør 0,5-2 gange den EC3-middelværdi, der er specificeret for henholdsvis HCA (10 %) og DNCB (0,05 %) i LLNA (se tabel 1).

▼**M3**

Tillæg 2

Definitioner

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (14).

Referencestof: Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Beregnet koncentrationstærskel (ECt): Beregnet koncentration af det teststof, der er påkrævet for at fremkalde et stimulationsindeks, der er indikativt for en positiv respons.

Beregnet koncentration tre (EC3): Beregnet koncentration af det teststof, der er påkrævet for at fremkalde et stimulationsindeks på tre.

Falsk negativ: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt.

Falsk positiv: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt.

Fare: Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (14).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (14).

Me-too-test: Gængs udtryk for en testmetode, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referencetestmetode. En sådan testmetode underkastes ofte en catch-up-validering. Benyttes som synonym for tilsvarende testmetode (14).

Outlier: En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

Ydeevnestandarder (PS): Standarder, som med udgangspunkt i en valideret testmetode giver mulighed for at vurdere, om en foreslået testmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De indeholder bl.a.: i) de centrale dele af testmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede testmetodes ydeevne er acceptabel, iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede testmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede testmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (14).

Beskyttet testmetode: En testmetode, hvor fremstilling og distribution er beskyttet af patenter, ophavsrettigheder, varemærker osv.

▼**M3**

Kvalitetssikring: En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

Referencekemikalier: Kemikalier, der anvendes i valideringsprocessen, hvor respons i in vitro eller in vivo-referencetestsystemet eller de pågældende arter allerede er kendt. Disse kemikalier skal være repræsentative for de kemiske stofgrupper, som testmetoden forventes at blive anvendt på, og skal repræsentere hele det forventede responsområde for de kemikalier, som den anvendes til, fra kraftig til svag eller negativ respons. Det kan være nødvendigt at anvende forskellige referencekemikalier i de forskellige faser i valideringsprocessen og til forskellige testmetoder og testformål (14).

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (14).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (14).

Hudsensibilisering: En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

Stimulationsindeks (SI): En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

Teststof (eller testkemikalie): Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

Valideret testmetode: En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (14).

▼B

B.43. **NEUROTOKSICITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE**

1. **METODE**

Metoden svarer til OECD TG 424 (1997).

Denne forsøgsmetode har til formål at give den nødvendige information for at kunne bekræfte eller nærmere karakterisere af den potentielle neurotoksicitet af kemiske stoffer i voksne dyr. Den kan enten kombineres med eksisterende metoder til toksicitetsundersøgelse ved gentagen indgift eller kan udføres som en separat undersøgelse. Det anbefales at konsultere OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) med henblik på design af undersøgelser baseret på denne testmetode. Navnlig er dette vigtigt, hvis man overvejer at ændre på de observationer og testprocedurer, som anbefales til rutinemæssig brug af metoden. Det nævnte Guidance Document er udarbejdet med henblik på at lette valget af andre testprocedurer til brug under givne omstændigheder.

Vurdering af udviklingsneurotoksicitet er ikke omfattet af denne metode.

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af kemiske stoffers toksiske egenskaber er det vigtigt, at potentialet for neurotoksiske virkninger tages i betragtning. I metoden til systemisk toksicitetsundersøgelse med gentagen indgift indgår allerede screening for neurotoksisk potentiale. Metoden kan benyttes til at fastlægge design for en undersøgelse, der supplerer eller bekræfter de neurotoksiske virkninger, som er set i undersøgelserne for systemisk toksicitet ved gentagen indgift. Når man betragter det neurotoksiske potentiale af visse kategorier af kemiske stoffer, kan disse tænkes at ville blive vurderet mere korrekt, hvis denne metode anvendes, uden at man på forhånd har fået nogen indikation af stoffernes neurotoksiske potentiale fra forsøg med systemisk toksicitet ved gentagen indgift. Sådanne betragtninger kan f.eks. bestå i.

— observation af neurologiske symptomer eller neuropatologiske forandringer i andre toksicitetsundersøgelser end forsøg med gentagen indgift, eller

— strukturelt slægtskab eller andre oplysninger, der kæder stofferne sammen med kendte neurotoksiske stoffer.

Derudover kan det i andre tilfælde være hensigtsmæssig at benytte denne metode; for nærmere enkeltheder henvises til (1).

Denne metode er udviklet således, at den kan tilpasses med henblik på at bekræfte givne histopatologiske og adfærdsmæssige neurotoksiske egenskaber ved et kemisk stof foruden at karakterisere og kvantificere den neurotoksiske respons.

▼B

Tidligere blev neurotoksicitet anset for at være ensbetydende med neuropati ledsaget af neuropatologiske forandringer eller af neurologisk dysfunktion, som f.eks. kramper, lammelse eller tremor. Skønt neuropati er en vigtig manifestation af neurotoksicitet, er det nu klart, at der er mange symptomer på toksisk effekt på nervesystemet (f.eks. nedsat motorisk koordination, nedsat sansefunktion, indlærings- og hukommelsesdysfunktion), som ikke nødvendigvis afspejler sig i neuropati eller i andre typer forsøg.

Denne neurotoksicitets-forsøgsmetode er udformet med henblik på at finde væsentlige neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske virkninger i voksne gnavere. Skønt adfærdspåvirkninger, også uden morfologiske forandringer, kan afspejle en negativ påvirkning af organismen, er det ikke alle adfærdsændringer, der er specifikke for nervesystemet. Derfor bør eventuelle observerede forandringer vurderes i sammenhæng med sideløbende histopatologiske, hæmotologiske og biokemiske data foruden data vedrørende andre former for systemisk toksicitet. I de test, der anvendes i denne metode til karakterisering og kvantificering af neurotoksisk respons, indgår specifikke histopatologiske og adfærdsmæssige metoder, som yderligere kan understøttes gennem elektrofysiologiske og/eller biokemiske undersøgelser (1)(2)(3)(4).

Neurotoksiske stoffer kan virke på en række steder i nervesystemet og ved forskellige mekanismer. Da der ikke findes nogen enkelt række test, der giver mulighed for tilbundsgående vurdering af det neurotoksiske potentiale af alle stoffer, kan det være nødvendigt at anvende andre in vivo- eller in vitro-test, som er specifikt rettet mod den observerede eller forventede form for neurotoksisk virkning.

Denne testmetode kan desuden, i forbindelse med den vejledning, der gives i OECD's Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1), anvendes tit nærmere karakterisering eller forbedring af følsomheden af kvantificeringen af dosis-responsforholdet med henblik på at kunne opstille et bedre skøn over No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), eller på at underbygge kendte eller formodede farer ved det kemiske stof. For eksempel kan der udformes undersøgelser til fastlæggelse og vurdering af neurotoksiske mekanismer eller supplering af de oplysninger, der allerede kan fås ved hjælp af grundlæggende neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske observationsmetoder. Sådanne undersøgelser behøver ikke dublere de data, der fås ved brug af de i denne metode anbefalede standardmetoder, når sådanne data allerede foreligger og ikke anses for nødvendige til fortolkning af undersøgelsens resultater.

Denne neurotoksikologiske undersøgelse, anvendt alene eller i kombination, giver oplysninger, som kan:

— fastslå, om nervesystemet påvirkes permanent eller reversibelt af det testede kemiske stof

— bidrage til karakterisering af de nervesystemforandringer, der er forbundet med udsættelse for det kemiske stof, og til forståelsen af den underliggende mekanisme

▼B

— fastlægge dosis- og tidsrespons-forholdet med henblik på bestemmelse af et skønnet niveau, der er uden observerede sundhedsmæssigt uønskede effekter, (og som kan danne grundlag for fastsættelse af sikkerhedsniveau for det kemiske stof).

I metoden administreres teststoffet oralt. Andre administrationsveje (f.eks. ved dermal applikation eller inhalation) kan være mere velegnede og kan kræve tilpasning af den anbefalede fremgangsmåde. Overvejelser vedrørende valg af administrationsvej bygger på stoffets profil med hensyn til eksponering af mennesker og på foreliggende toksikologiske og kinetiske oplysninger.

1.2. DEFINITIONER

Sundhedsmæssigt uønsket virkning: enhver sådan behandlingsrelateret afvigelse fra den normale variation, som forringer en organismes overlevelsesevne, reproduktionsevne eller tilpasningsevne til omgivelserne.

Dosis: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde (g, mg) teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg), eller som fast koncentration i føden (ppm).

Dosering: et generelt udtryk, som indbefatter dosis, doseringens hyppighed og anvendelsens varighed.

Neurotoksicitet: en negativ ændring i nervesystemets struktur eller funktion som følge af udsættelse for et kemisk, biologisk eller fysisk agens.

Neurotoksisk agens: ethvert kemisk, biologisk eller fysisk agens med potentiale til at fremkalde neurotoksicitet.

NOAEL: forkortelse for »no-observed-adverse-effect level«, dvs. det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede uønskede virkninger.

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Teststoffet administreres oralt ved forskellige doser til forskellige grupper af gnavere. Normalt kræves gentagen dosering, og dosisregimet kan være 28 dages indgift, subkronisk (90 dage) eller kronisk (1 år eller længere). Procedurerne i denne testmetode kan ligeledes anvendes til et forsøg for akut neurotoksicitet. Dyrene testes, således at man kan påvise og karakterisere anomalier af adfærdsmæssig eller neurologisk art. I hver observationsperiode vurderes adfærden på en række punkter, som kan tænkes påvirket af neurotoksiske stoffer. Ved testens slutning bliver en undergruppe af dyr af hvert køn fra hver gruppe perfunderet in situ, og af hjerne, rygmarv og perifere nerver fremstilles snit, som undersøges.

Når undersøgelsen fungerer som enkeltstående undersøgelse til screening for neurotoksicitet eller til karakterisering af neurotoksiske virkninger, kan de dyr i hver gruppe, som ikke er anvendt til perfusion og efterfølgende histopatologisk undersøgelse (se tabel 1), anvendes til specifikke neuroadfærdsmæssige, neuropatolotiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, som kan supplere de data, man har fået ved hjælp af standardundersøgelserne i denne metode (1). Sådanne supplerende procedurer kan være særlig nyttige, når empiriske observationer eller forventede virkninger peger på neurotoksicitet af specifik art eller med et specifikt mål. Alternativt kan de tilbageværende dyr anvendes til vurderinger som f.eks. dem, der foreskrives i metoder til toksicitetsundersøgelser med gentagen indgift i gnavere.

▼B

Når procedurerne i denne forsøgsmetode kombineres med procedurerne i andre forsøgsmetoder, skal antallet af dyr være tilstrækkeligt til at opfylde kravene om observationer i begge undersøgelser.

1.4. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, emn en anden gnaverart kan anvendes, når begrundelse herfor gives. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Doseringen skal normalt begynde snarest muligt efter fravænning, fortrinsvis senest ved seks ugers alderen, og under alle omstændigheder før ni ugers alderen. Når denne undersøgelse kombineres med andre undersøgelser, kan det dog være nødvendigt at tilpasse dette alderskrav. Ved forsøgets begyndelse må vægtvariationen mellem de anvendte dyr ikke være over 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Når en kortvarig toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering udføres som indledning til en langvarig undersøgelse, skal de anvendte dyr i de to undersøgelser være af samme stamme og oprindelse.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Høj intermitterende støj skal holdes på et minimum. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af teststoffet, når denne administrationsmåde anvendes. Dyrene kan enten anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn.

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Unge raske dyr tilordnes behandlings- og kontrolgrupper på tilfældig måde. Burene arrangeres, så at eventuelle virkninger af burenes placering minimeres, Dyrene mærkes entydigt, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

1.4.4. **Indgiftsvej og fremstilling af doserne**

Metoden vedrører specifikt oral indgift af teststoffet. Oral indgift kan ske ved gavage, tilsætning til foder eller drikkevand, eller gennem kapsler. Der kan anvendes andre adrninistrationsveje (f.eks. dermal applikation eller inhalation), men i så fald kan det blive nødvendigt at tilpasse den anbefalede fremgangsmåde. I overvejelser vedrørende valg af administrationsvej indgår stoffets profil med hensyn til eksponering af mennesker og foreliggende toksikologiske og kinetiske oplysninger. Den valgte administrationsvej og deraf følgende ændringer af procedurerne i denne forsøgsmetode skal begrundes.

▼B

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, efterfulgt af en opløsning/suspension i olie (f.eks majsolie), og derefter eventuel opløsning i andre vehikler. Vehiklets toksiske egenskaber skal være kendt. Derudover skal følgende egenskaber ved vehiklet tages i betragtning: dets effekt på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention med deraf følgende eventuel ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand.

1.5. PROCEDURER

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Når undersøgelsen udføres som enkeltstående undersøgelse, skal der anvendes mindst 20 dyr (10 hunner og 10 hanner) i hver dosis- og kontrolgruppe til detaljeret klinisk og funktionsmæssig observation. Af disse 10 hanner og 10 hunner udvælges mindst fem hanner og fem hunner, som perfunderes in situ og gennemgår detaljeret neurohistopatologisk undersøgelse ved forsøgets afslutning. Når kun et begrænset antal dyr i en given dosisgruppe observeres for tegn på neurotoksiske virkninger, skal det overvejes at lade de pågældende dyr indgå blandt dem, der udvælges til perfusion. Når undersøgelsen udføres i kombination med en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering, skal antallet af dyr være tilstrækkeligt til at opfylde målene i begge undersøgelser. Det minimale antal dyr i hver gruppe ved forskellige kombinationer af undersøgelser er givet i tabel 1. Hvis der planlægges interimsaflivninger eller restitutionsgrupper til observation for toksiske virkningers reversibilitet, persistens eler forsinkede indtræden efter behandling, eller hvis supplerende observationer overvejes, skal antal dyr øges, så der er tilstrækkeligt med dyr til rådighed for observation og histopatologisk undersøgelse.

1.5.2. **Behandlings- og kontrolgruppe**

Sædvanligvis skal der være mindst tre dosisgrupper og en kontrolgruppe, men hvis andre data ikke giver anledning til at forvente virkning af en gentagen dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, kan en grænsetest udføres. Foreligger der ikke egnede data, kan der udføres et dosistitreringsforsøg for at lette fastlæggelsen af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i behandlingsgruppen. Anvendes vehikel til administration af teststoffet, skal dyrene i kontrolgruppen modtage vehiklet i den største anvendte volumen.

1.5.3. **Kvalitetskontrol**

Det laboratorium, som udfører undersøgelsen, skal fremlægge data, som godtgør laboratoriets egnethed til at udføre undersøgelsen og følsomheden af de anvendte metoder. Sådanne data skal dokumentere evnen til at påvise og, når det er hensigtsmæssigt, kvantificere ændringer i de forskellige effektparametre, som anbefales observeret, således autonome symptomer, sensorisk reaktionsformåen, gribestyrke af lemmerne og motorisk aktivitet. Oplysninger om kemiske stoffer, som fremkalder forskellige former for neurotoksisk respons og kan anvendes som positive kontrolstoffer, findes i henvisning (2) til (9). Historiske data kan anvendes, hvis den eksperimentelle metode i alt væsentligt er den samme. Jævnlig ajourføring af historiske data anbefales. Når forsøgslaboratoriet på væsentlige punkter ændrer udførelsen af forsøget eller procedurerne, skal der forelægges nye data, som godtgør metodernes fortsatte følsomhed.

▼B

1.5.4. **Valg af dosis**

Dosisniveauet vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitets- og kinetikdata for teststoffet og beslægtede stoffer. Det højeste dosisniveau vælges med henblik på at fremkalde neurotoksisk effekt eller tydelig systemisk toksisk effekt. Derefter vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons, og som laveste dosisniveau et niveau, hvor ingen skadelig effekt iagttages (NOAEL). I princippet skal dosisniveauerne fastsættes således, at de primære toksiske virkninger på nervesystemet kan skelnes fra virknigner knyttet til den systemiske toksicitet. I mange tilfælde vil to til tre intervaller være optimalt, og ofte må det foretrækkes at tilføje en fjerde behandlingsgruppe frem for at operere med meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. Når der foreligger et rimeligt skøn over den humane eksponering, må også dette tages i betragtning.

1.5.5. **Grænsetest**

Når et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/døgn med de beskrevne metoder ikke fremkalder observerbar neurotoksisk virkning, og når heller ikke foreliggende data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser giver anledning til at forvente nogen virkning, er et komplet forsøg med tre dosisniveauer ikke nødvendigvis påkrævet. Den forventede eksponering af mennesker kan betyde, at der anvendes et højere oralt dosisniveau i grænseforsøget. For andre indgiftsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for det maksimale opnåelige eksponiringsniveau. Til brug for en oral akut undersøgelse bør dosis ved grænsetesten være mindst 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Administration af doserne**

Dyrene doseres med teststoffet dagligt syv dage om ugen i en periode af mindst 28 dage; bruges fem-dages dosisregime eller kortere eksponeringstid, skal dette begrundes, Administreres teststoffet ved gavage, skal det ske som enkeltdosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt. Ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende indtil 2 ml/100 g kropsvægt. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis forstærkes ved højere koncentration, skal variation af testvolumenet minimeres ved at justere koncentrationen, så volumenet er konstant ved alle dosisniveauer.

For teststoffer, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende stof i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Ved indgift af teststoffet i foderet kan stoffet enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; den anvendte mulighed skal specificeres. Ved indgift med sonde skal dosis gives på tilsvarende tidspunkt hver dag og efter behov justeres, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Når der som indledning til en langtidsundersøgelse udføres et korttids-toksicitetsforsøg med gentagen dosering, skal der i de to undersøgelser anvendes ensartet foder. Når det i et akut toksicitetsforsøg ikke er muligt at indgive den pågældende stofmængde som en enkelt dosis, kan den undtagelsesvis administreres delt inden for en periode af højst 24 timer.

▼B

1.6. OBSERVATION

1.6.1. **Hyppighed af observationer og test**

I forsøg med gentagen dosering skal observationsperioden omfatte doseringsperioden. I akutte undersøgelser skal iagttages en 14-dages efterbehandlingsperiode. For dyr i satellitgrupper, som holdes uden eksponering i en efterbehandlingsperiode, skal observationerne ligeledes omfatte denne periode.

Observationerne skal finde sted tilstrækkelig hyppigt til at maksimere sandsynligheden for at påvise eventuelle adfærdsmæssige og/eller neurologiske anomalier. Observationerne skal fortrinsvis finde sted på samme tidspunkt hver dag, idet man retter sig efter tidspunktet for den forventede maksimale effekt af indgiften. I tabel 2 vises hyppigheden af de kliniske observationer og funktionsprøver. Hvis kinetiske eller andre data fra tidligere undersøgelser viser, at der bør benyttes andre tidspunkter til observationer, test eller post-observationsperioder, skal der benyttes en alternativ plan med henblik på at skaffe flest mulige oplysninger. Eventuelle ændringer af planen skal begrundes.

1.6.1.1. *Observationer af almindelig sundhedstilstand og mortalitet/morbiditet*

Alle dyr observeres nøje mindst en gang dagligt med hensyn til deres almindelige helbredstilstand og to gange dagligt for morbiditet og mortalitet.

1.6.1.2. *Detaljerede kliniske observationer*

Der foretages detaljerede kliniske observationer af alle dyr, som er udvalgt til dette formål (se tabel 1) én gang inden første eksponering (for at sammenligne gentagne observationer af samme individ) og derefter med forskellige intervaller, alt efter undersøgelsens varighed (se tabel 2). Ved restitutionsperiodens slutning foretages detaljerede kliniske observationer af satellit-restitutionsgrupperne. Detaljerede kliniske observationer finder sted uden for opholdsburet på en »open field«. Observationerne registreres nøje med brug af bedømmelsessystemer, der omfatter kriterier eller bedømmelsesskalaer for hver af de til observationerne hørende målinger. De anvendte kriterier eller skalaer skal være tydeligt fastlagt af testlaboratoriet. Der skal drages omsorg for at sikre, at variationerne i forsøgsbetingelserne er mindst mulige (ikke systematisk behandlingsrelaterede) og at observationerne foretages af faguddannede observatører, som er uden viden om den pågældende behandling.

Det anbefales, at observationerne udføres på struktureret måde, således at veldefinerede kriterier (herunder definition af »normalområdet«) systematisk finder anvendelse på hvert dyr på hvert observationstidspunkt. »Normalområdet« skal være veldokumenteret. Alle observerede tegn skal registreres. Også størrelsesordenen af de observerede tegn registreres, når det er muligt. De kliniske observationer skal omfatte, men er ikke begrænset til, ændringer i hud, skin, øjne, slimhinder, optræden af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, pilorektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster og/eller mundrespiration, eventuelle symptomer vedrørende vandladning eller defækation, samt farveforandringer af urinen).

▼B

Eventuel usædvanlig respons med hensyn til kropsstilling, aktivitetsniveau (f.eks nedsat eller øget udforskning af »open field«) og koordinering af bevægelser registreres ligeledes. Ændringer i gangen (f.eks vralten, ataksi), stilling (f.eks. pukkelrygget) og reaktion på håndtering samt optræden af kloniske eller toniske bevægelser, kramper eller tremor, stereotypier (f.eks. overdreven pleje af pels, usædvanlige bevægelser af hovedet, gentagne cirkelbevægelser) eller bizar adfærd (bidning eller overdreven slikning, selvmutilering, baglæns gang, vokalisation) eller aggression protokolleres.

1.6.1.3. *Funktionsprøver*

I lighed med de detaljerede kliniske observationer skal funktionsprøver udføres én gang før eksponering og derefter hyppigt for alle dyr, der er udvalgt til dette formål (se tabel 1). Hyppigheden af funktionsprøverne fastsættes ligeledes i henhold til undersøgelsens varighed (se tabel 2). Ud over de i tabel 2 angivne observationsperioder foretages observation af satellit-restitutionsgrupper så tæt som muligt på tidspunktet for den afsluttende aflivning. Funktionsprøverne skal omfatte sensorisk reaktionsformåen på forskellige stimuli (f.eks auditive, visuelle og proprioceptive (5)(6)(7)), bedømmelse af lemmernes gribestyrke (8) samt bedømmelse af motorisk aktivitet (9). Den motoriske aktivitet måles med en automatiseret anordning, som kan registrere både fald og stigning i aktivitet. Anvendes et andet system, skal dette være kvantitativt, og dets følsomhed og pålidelighed skal være godtgjort. Hver anordning skal afprøves for at sikre varig pålidelighed af og overensstemmelse mellem anordningerne. Nærmere detaljer om de fremgangsmåder, der kan benyttes, er givet i de pågældende litteraturhenvisninger. Hvis der ikke er data, som peger på potentielle neurotoksiske virkninger (f.eks. vedrørende struktur-aktivitet, epidemiologiske data, andre toksikologiundersøgelser), må man overveje mere specialiserede test af sensoriske og motoriske funktioner eller indlæring og hukommelse for at undersøge disse mulige virkninger i nærmere detaljer. Nærmere oplysninger om specialiserede test og deres anvendelse er givet i (1).

Undtagelsesvis kan man i den pågældende test udelade dyr, som viser tegn på toksicitet af et omfang, som vil forstyrre funktionstesten væsentligt. Elimination af dyr fra en funktionstest skal begrundes.

1.6.2. **Kropsvægt og foder-/vandindtagelse**

I undersøgelser af indtil 90 dages varighed skal alle dyr vejes mindst én gang om ugen, og ligeledes mindst én gang om ugen måles foderindtagelsen (vandindtagelsen, når teststoffet administreres i vandet). I langtidsundersøgelser vejes alle dyr mindst én gang om ugen i de første 13 uger, derefter mindst én gang hver fjerde uge. Foderindtagelsen (vandindtagelsen, når teststoffet indgives i vandet) måles mindst én gang om ugen de første 13 uger, derefter ca. hver tredje måned, medmindre dyrenes sundhedstilstand eller ændringer i kropsvægt tilsiger noget andet.

▼B

1.6.3. **Oftalmologi**

I undersøgelser af længere varighed end 28 dage foretages oftalmologisk undersøgelse med oftalmoskop eller tilsvarende egnet instrument inden indgift af teststoffet og ved undersøgelsens slutning, helst på alle dyr, men i det mindste på dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der findes øjenforandringer eller de kliniske symptomer viser, at der er behov derfor, skal alle dyr undersøges. I langtidsundersøgelser skal der endvidere foretages en oftalmologisk undersøgelse ved 13 uger. Oftalmologisk undersøgelse behøver ikke udføres, når sådanne data allerede foreligger fra andre undersøgelser med tilsvarende varighed og dosisniveau.

1.6.4. **Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver**

Når neurotoksicitetsundersøgelsen udføres i kombination med en systemisk toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering, foretages hæmatologisk undersøgelse og klinisk-biokemiske bestemmelser som angivet i den pågældende metode til systemiske toksicitetsforsøg. Prøvetagning skal ske således, at en eventuel påvirkning af neuroadfærd bliver mindst mulig.

1.6.5. **Histopatologi**

Den neuropatologiske undersøgelse skal være udformet, så den supplerer og udvider de observationer, der er gjort i undersøgelsens in vivo-fase. Væv fra mindst fem dyr/køn/gruppe (se tabel 1 og næste afsnit) fikseres in situ med almindeligt anerkendte perfusions- og fiksationsteknikker (se henvisning (3), kapitel 5, og henvisning (4), kapitel 50). Alle makroskopiske forandringer protokolleres. Når undersøgelsen udføres som enkeltstående screening for neurotoksicitet eller til karakterisering af neurotoksiske virkninger, kan de resterende dyr enten bruges til specifikke neuroadfærdsmæssige (10)(11), neuropatologiske (10)(11)(12)(13), neurokemiske (10)(11)(14)(15) eller elektrofysiologiske (10)(11)(16)(17) procedurer, som kan supplere de her beskrevne procedurer og undersøgelser, eller til at øge det antal dyr, som undersøges histopatologisk. Sådanne supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer eller forventede virkninger peger på neurotoksicitet af specifik art eller med specifikt målorgan (2)(3). Alternativt kan de resterende dyr også bruges til rutinemæssig patologisk bedømmelse som beskrevet i metoden til undersøgelser med gentagen dosering.

Alle paraffinindstøbte vævsprøver farves med en all-round farvemetode som hematoxylin-eosin og undersøges mikroskopisk. Hvis der observeres eller formodes at være tegn på perifer neuropati. skal plastindstøbte prøver af perifert nervevæv undersøges. Kliniske symptomer kan også give anledning til, at der vælges supplerende prøvetagningssteder eller benyttes specialfarvning. Vejledning om supplerende prøvetagningssteder kan findes i (3)(4). Passende specialfarvning til påvisning af bestemte typer patologiske forandringer kan ligeledes være nyttig (18).

▼B

Repræsentative snit af centralnervesystem og det perifere nervesystem undersøges histologisk (se henvisning (3), kapitel 5 og henvisning (4), kapitel 50). De undersøgte områder skal normalt omfatte forhjerne, den centrale del af cerebrum, herunder et snit gennem hippocampus, midterhjernen, cerebellum, pons, medulla oblongata, øjet med nervus opticus og retina, rygmarven med intumescentia cervicalis og lumbalis, de dorsale rodganglier, fibre fra de dorsale og ventrale rødder, den proksimale del af nervus sciaticus, den proksimale del af nervus tibialis (ved knæene) og lægmuskelgrenene af nervus tibialis. Der skal være både tværsnit og længdesnit af rygmarv og perifere nerver. Man skal være opmærksom på nervesystemets kar. En prøve af skeletmuskel, helst lægmusklen, skal ligeledes undersøges. Især skal man være opmærksom på celle- og fiberstruktur i de dele af centralnervesystem og det perifere nervesystem, der særligt påvirkes af neurotoksiske stoffer.

Vejledning i de neuropatologiske forandringer, der typisk resulterer af toksisk påvirkning, findes i henvisning (3)(4). Trinvis undersøgelse af vævsprøverne anbefales, således at snittene fra højdosisgrupperne først sammenlignes med dem fra kontrolgrupperne. Ses ingen neuropatologiske forandringer i prøverne fra disse grupper, er efterfølgende analyse unødvendig. Er der neuropatologiske forandringer i højdosisgruppen, skal prøver fra hvert af de potentielt berørte væv fra mellem- og lavdosisgrupperne kodes og undersøges sekventielt.

Findes der ved den kvalitative undersøgelse tegn på neuropatologiske forandringer, udføres endnu en undersøgelse af alle de dele af nervesystemet, som udviser sådanne forandringer. Snit fra alle dosisgrupper fra hver af de potentielt berørte regioner kodes og undersøges vilkårligt uden kendskab til koden. For hver forandring registreres dens frekvens og sværhed. Når alle regioner fra alle dosisgrupper er blevet bedømt, kan koden brydes og statistisk analyse foretages til bedømmelse af dosis-respons-forholdet. For hver forandring skal der gives eksempler på beskrivelse af forskellige sværhedsgrader.

De neuropatologiske fund bedømmes i sammenhæng med de adfærdsmæssige observationer og målinger samt øvrige data fra forudgående og sideløbende toksicitetsundersøgelser af teststoffet.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover sammenfattes alle data i tabelform med angivelse, for hver forsøgs- og kontrolgruppe, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af de observerede toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed, art og sværhed af alle toksiske virkninger, antal dyr, som udviser forandringer, herunder forandringernes art og sværhed.

▼B

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Undersøgelsens fund bedømmes med hensyn til forekomst, sværhed og korrelation mellem neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske virkninger (foruden neurokemiske og elektrofysiologiske virkninger, når supplerende undersøgelser indgår) samt eventuelle andre observerede negative virkninger. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Valg af statistisk metode skal finde sted i forbindelse med fastlæggelsen af undersøgelsens design.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk beskaffenhed (herunder isomeri, renhed og fysisk-kemisk egenskaber)

— identifikationsdata.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, opstaldning, foder, osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

For forsøgsbetingelserne:

— oplysninger om formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

— specifikation af de indgivne doser, herunder enkeltheder vedrørende vehiklet, volumen og fysisk tilstand af det indgivne materiale

— oplysninger om administration af teststoffet

— begrundelse for de valgte dosisniveauer

— begrundelse for administrationsvej og eksponeringens varighed

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— enkeltheder vedrørende foderets og vandets kvalitet.

For observationer og testprocedurer:

— enkeltheder vedrørende tilordningen af dyrene i hver gruppe til perfusionsundergrupper

— enkeltheder vedrørende bedømmelsessystemet, herunder kriterier og bedømmelsesskalaer for hver i de til de detaljerede kliniske observationer hørende målinger

▼B

— detaljeret beskrivelse af funktionstest af sensorisk reaktionsformåen på forskellige stimuli (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive), til bedømmelse af lemmernes gribestyrke, til vurdering af motorisk aktivitet (herunder enkeltheder vedrørende automatiserede anordninger til detektion af aktivitet) samt eventuelle andre procedurer, som anvendes

— detaljeret beskrivelse af oftalmologiske undersøgelser og, i givet fald, hæmatologiske og klinisk biokemiske undersøgelser med relevante normalværdier

— detaljeret beskrivelse af de enkelt neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske, neurokemiske og elektrofysiologiske procedurer.

Resultater:

— kropsvægt/kropsvægtændringer, herunder kropsvægt ved aflivning

— fødeindtagelse og vandindtagelse, når det er relevant

— data vedrørende toksisk respons for hvert køn og dosisniveau, herunder toksicitetstegn og dødelighed

— art, sværhedsgrad og varighed (indsætten og efterfølgende forløb) af detaljerede kliniske observationer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— detaljeret beskrivelse af resultaterne af alle funktionstest

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af resultaterne af alle neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske og neurokemiske eller elektrofysiologiske fund, hvis de foreligger

— data vedrørende absorption og metabolisme, hvis de foreligger

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne

Diskussion af resultaterne:

— oplysninger vedrørende dosis-respons-forhold

— eventuelle andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende teststoffets neurotoksiske potentiale

— angivelse af NOAEL

Konklusioner:

— det anbefales, at der afgives en konkret erklæring om den samlede neurotoksicitet af teststoffet.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD Giudance Document on Neorutoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guidline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins, Battimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980), Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel. K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic, Appl, Pharmacol., 108, 267-283.

(8) 8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(9) 9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabel 1

Mindste antal dyr pr. gruppe, når neuroloksicitetsundersøgelsen udføres separat eller i kombination med andre undersøgelser

	Neurotoksicitetsundersøgelse udført som:			
	Separat undersøgelse	Kombineret med 28-dages forsøg	Kombineret med 90-dages forsøg	Kombineret med det kroniske toksicitetsforsøg
Samlet antal dyr pr. gruppe	10 hanner og 10 hunner	10 hanner og 10 hunner	15 hanner og 15 hunner	25 hanner og 25 hunner
Antal dyr udvalgt til funktionstestning, herunder detaljerede kliniske observationer	10 hanner og 10 hunner	10 hanner og 10 hunner	10 hanner og 10 hunner	10 hanner og 10 hunner
Antal dyr udvalgt til perfusion in situ og neurohistopatologisk undersøgelse	5 hanner og 5 hunner	5 hanner og 5 hunner	5 hanner og 5 hunner	5 hanner og *5* hunner
Antal dyr udvalgt til observation af toksicitet ved gentagen dosering/ subkronisk/kronisk forsøg, hæmatologisk undersøgelse, klinisk-biokemisk undersøgelse, histopatologisk undersøgelse osv. som angivet i de respektive *Guidelines*		5 hanner og 5 hunner	10 hanner ([1]) og 10 hunner ([1])	20 hanner ([1]) og 20 hunner ([1])
Eventuelle supplerende observationer	5 hanner og 5 hunner			

([1]) Heri indgår fem dyr, som er udvalgt til funktionstestning og detaljerede kliniske observationer som led i neurotoksicitetsundersøgelsen.

▼B

Tabel 2

Hyppighed af kliniske observationer og funktionstest

Type observationer		Undersøgelsens varighed			
		Akut	28-dages	90-dages	Kronisk
I alle dyr	Generel sundhedstilstand	dagligt	dagligt	dagligt	dagligt
	Mortalitet/morbiditet	To gange dagligt	To gange dagligt	To gange dagligt	To gange dagligt
I dyr, som er udvalgt til observation af funktioner	Detaljerede kliniske observationer	— inden første eksponering — senest 8 timer efter dosering ved det skønnede tidspunkt for maksimal effekt — på dag 7 og 14 efter dosering	— inden første eksponering — derefter en gang om ugen	— inden første eksponering — én gang under den første eller anden uges eksponering — derefter en gang om måneden	— inden første eksponering — én gang efter den første måneds eksponering — derefter hver tredje måned
	Funktionsprøver	— inden første eksponering — senest 8 timer efter dosering det skønnede tidspunkt for maksimal effekt — på dag 7 og 14 efter dosering	— inden første eksponering — under den fjerde uges behandling så nær eksponeringsperiodens slutning som muligt	— inden første eksponering — én gang under den første eller anden uges eksponering — derefter en gang om måneden	— inden første eksponering — én gang efter den første måneds eksponering — derefter hver tredje måned

▼B

B.44. **HUDABSORPTION: IN VIVO-METODE**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 427 (2004).

1.1. INDLEDNING

Skønt det for mange kemiske stoffers vedkommende hovedsagelig er gennem huden, at eksponering forekommer, anvendes der oral indgift i de fleste toksikologiske undersøgelser i forsøgsdyr. I denne guideline beskrives en in vivo-undersøgelsesmetode for perkutan absorption, der danner det bindeled, man behøver for at ekstrapolere fra orale undersøgelser og foretage en sikkerhedsvurdering efter eksponering af huden.

For at få adgang til kredsløbet må et stof trænge gennem mange cellelag i huden. For de fleste stoffers vedkommende er det hastighedsbestemmende lag stratum corneum, der består af døde celler. Hudens permeabilitet afhænger dels af det kemiske stofs lipofile egenskaber, dels af tykkelsen af det yderste lag af epidermis, og dels faktorer som stoffets molekylvægt og koncentration. Hud fra rotter og kaniner er sædvanligvis mere permeabel end hud fra mennesker, mens permeabiliteten af hud fra marsvin og aber bedre svarer til menneskets.

Metoder til måling af perkutan absorption kan inddeles i to kategorier: in vivo og in vitro. In vivo-metoderne er gode til at give oplysninger om hudabsorptionen i forskellige laboratoriedyrearter. I den senere tid er der udviklet in vitro-metoder. Med dem undersøges transporten gennem dyre- eller menneskehud i hel eller partiel tykkelse til et væskereservoir. In vitro-metoden er beskrevet i en særskilt testmetode (1). Med henblik på valg af den bedst egnede metode under de givne betingelser anbefales det at støtte sig til OECD's Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2), der nærmere beskriver in vivo- og in vitro-metodernes anvendelighed.

Med den her beskrevne in vivo-metode kan prøvestoffets penetration gennem huden til det systemiske rum bestemmes. Teknikken har fundet udbredt anvendelse i en længere årrække (3)(4)(5)(6)(7). Skønt in vitro-undersøgelser af perkutan absorption i mange tilfælde kan være hensigtsmæssige, kan der forekomme situationer, hvor kun et in vivo-forsøg giver de nødvendige oplysninger.

Fordelene ved in vivo-metoden er, at der anvendes et fysiologisk og metabolisk intakt system, at dyrearten er den samme som i mange toksicitetsundersøgelser, og at metoden kan tilpasses andre dyrearter. Ulemperne er, at der anvendes levende dyr, at der må bruges radioaktivt mærket stof for lettere at skaffe pålidelige resultater, at den tidlige absorptionsfase er vanskelig at bestemme, og at permeabiliteten af hud fra den foretrukne art (rotte) afviger fra den menneskelige huds. Hud fra dyr er sædvanligvis lettere permeabel, hvilket kan medføre overvurdering af den perkutane absorption i mennesker (6)(8)(9). Ætsende stoffer bør ikke testes i levende dyr.

▼B

1.2. DEFINITIONER

Uabsorberet dosis: den del af dosis, der vaskes af hudoverfladen efter eksponering, og den, der findes på den ikke lukkede afdækning, samt den del, der påvises at forflygtiges fra huden under eksponeringen.

Absorberet dosis (in vivo): den del af dosis, der er til stede i urin, vaskevand fra bure, fæces, udåndingsluft (hvis den måles), blod, væv (hvis dette opsamles) og resten af kadaveret efter fjernelse af huden fra påføringsstedet.

Absorberbar dosis, den del af dosis, der er til stede på eller i huden efter afvaskning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet, helst radioaktivt mærket, påføres den glatragede hud på dyrene i en eller flere passende doseringer i form af en repræsentativ, ibrugværende formulering. Testpræparatet efterlades i kontakt med huden i et fast tidsrum under en passende afdækning (ikke tillukket, delvis tillukket eller helt tillukket), der forhindrer, at dyret indtager testpræparatet. Når eksponeringstiden er gået, fjernes afdækningen, huden renses med passende rengøringsmiddel, afdækning og rengøringsmaterialer opbevares til analyse, og der anlægges en ny afdækning. Før, under og efter eksponeringsperioden holdes dyrene i individuelle metabolismebure, og ekskreter og udåndingsluft fra de pågældende perioder opsamles til analyse. Opsamling af udåndingsluft kan undlades, når der foreligger fyldestgørende oplysninger om, at der slet ikke eller kun i ringe omfang dannes radioaktive metabolitter. Normalt er der i hver undersøgelse flere grupper dyr, der eksponeres for testpræparatet. Én gruppe aflives ved udløb af eksponeringsperioden. De øvrige grupper aflives efterfølgende efter en fast tidsplan (2). Ved udløb af prøvetagningsperioden aflives de resterende dyr, blod opsamles til analyse, påføringsstedet fjernes til analyse, og kadaveret analyseres for eventuelt ikke udskilt stof. Prøvernes indhold bestemmes med egnede metoder, og graden af perkutan absorption beregnes (6)(8)(9).

1.4. BESKRIVELSE AF METODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den mest anvendte art er rotten, men der kan også anvendes ubehårede stammer eller arter med en hudabsorptionsrate bedre svarende til menneskets (3)(6)(7)(8)(9). Der benyttes unge voksne, raske dyr af samme køn (handyr er standardvalget) af sædvanligt anvendte laboratoriestammer. Ved testens begyndelse må intet dyr afvige mere end ± 20 % fra gennemsnitsvægten. Som eksempel på egnede dyr kan nævnes hanrotter på 200 g–250 g, navnlig i øverste halvdel af dette område.

▼B

1.4.2. **Dyrenes antal og køn**

Der skal være en gruppe på mindst fire dyr af samme køn for hvert testpræparat og hvert planlagt sluttidspunkt. Hver gruppe dyr aflives efter forskellige tidsrum, f.eks. ved afslutningen af eksponeringsperioden (typisk 6 eller 24 timer) og efterfølgende (f.eks. 48 og 72 timer). Er der påvist væsentlig forskel i hudtoksicitet mellem hanner og hunner, vælges det følsomste køn. I modsat fald vælges enten det ene eller det andet køn.

1.4.3. **Miljøbetingelser og fodring**

Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Der anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand. Under forsøget, og helst også under akklimatiseringen, skal dyrene være anbragt enkeltvis i metabolismebure. Risikoen for spild af foder og vand skal nedsættes til det mindst mulige, da man ellers vil få upålidelige resultater.

1.4.4. **Forberedelse af dyrene**

Dyrene mærkes, så de kan identificeres enkeltvis, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets begyndelse, for at de kan akklimatisere sig til laboratorieomgivelserne.

Efter akklimatiseringsperioden og ca. 24 timer inden dosering glatrages et hudområde omkring skuldre og ryg på hvert dyr. Dette skal ske forsigtigt, så skrabning af huden undgås, da beskadiget hud har andre permeabilitetsegenskaber end intakt hud. Efter glatragning og ca. 24 timer før påføring af prøvestoffet på huden (se punkt 1.4.7) aftørres huden med acetone for at fjerne talg. Supplerende vask med sæbe og vand frarådes, da eventuelle sæberester kan fremme absorptionen af teststoffet. Arealet skal have en størrelse, der muliggør en pålidelig beregning af den absorberede mængde teststof pr. cm^2 hud, helst mindst 10 cm^2. Denne arealstørrelse er praktisk mulig på rotter med kropsvægt 200-250 g. Efter forberedelse sættes dyrene tilbage i metabolismeburene.

1.4.5. **Teststof**

Teststoffet er den enhed, hvis penetrationsegenskaber skal undersøges. Ideelt bør teststoffet være radioaktivt mærket.

1.4.6. **Testpræparat**

Testpræparatet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Enhver afvigelse fra det »ibrugværende« præparat skal begrundes. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet bærestof. For andre bærestoffer end vand skal dets absorptionsegenskaber og potentielle vekselvirkning med teststoffet være kendt.

▼B

1.4.7. **Påføring på huden**

Et påføringssted med et nærmere bestemt overfladeareal afgrænses på hudoverfladen. En kendt mængde testpræparat fordeles derefter jævnt på stedet. Sædvanligvis anvendes en mængde svarende til den potentielle eksponering af mennesker, typisk 1-5 mg/cm^2 for faste stoffer og indtil 10 µl/cm^2 for væsker. Eventuelle andre mængder skal begrundes i de forventede anvendelsesbetingelser, forsøgets målsætning eller testpræparatets fysiske egenskaber. Efter påføring beskyttes det behandlede område mod vartning. Figur 1 viser et eksempel på en typisk anordning. Sædvanligvis tildækkes påføringsstedet med en ikke lukket afdækning (f.eks. permeabel nylongaze). Ved påføring af ubegrænsede doser bør påføringsstedet dog være tillukket. Når genfindingen af et halvflygtigt på grund af fordampning mindskes uacceptabelt (se også punkt 1.4.10, første afsnit), skal det fordampede stof opfanges i et aktivt kulfilter, der dækker påføringsanordningen (se figur 1). Det er vigtigt at eventuelle sådanne anordninger ikke beskadiger huden, absorberer testpræparatet eller reagerer med dette. Dyrene sættes tilbage i hvert sit metabolismebur med henblik på opsamling af ekskreter.

1.4.8. **Varighed af eksponering og prøvetagning**

Eksponeringens varighed er tidsrummet mellem påføring af testpræparatet og fjernelse af dette ved afvaskning af huden. Der vælges en eksponeringsperiode (typisk 6 eller 24 timer), som er relevant i forhold til forventede eksponeringsvarighed for mennesker. Efter eksponeringsperioden holdes dyrene i metabolismeburene indtil den planmæssige afslutning. Dyrene observeres for tegn på toksicitet/unormale reaktioner med regelmæssige mellemrum under hele forsøget. Ved afslutningen af eksponeringsperioden observeres den behandlede hud for synlige tegn på irritation.

Metabolismeburene skal muliggøre separat opsamling af urin og fæces under hele undersøgelsen. Desuden skal de muliggøre opsamling af ^{14}C-carbondioxid og flygtige ^{14}C-carbonforbindelser, som analyseres hvis de dannes i en mængde af over 5 %. Urin, fæces og udskilte væsker (f.eks. ^{14}C-carbondioxid og flygtige C-forbindelser) opsamles individuelt fra hver gruppe på hvert prøvetagningstidspunkt. Åbne bure kan anvendes, hvis det er tilstrækkeligt dokumenteret, at der kun i ringe omfang eller slet ikke dannes radioaktive metabolitter.

Ekskreter opsamles i eksponeringsperioden indtil 24 timer efter den indledende hudkontakt og derefter dagligt til forsøgets slutning. Normalt vil tre opsamlingstidspunkter for ekskreter være tilstrækkeligt, men testpræparatets påtænkte formål eller foreliggende kinetiske data kan tilsige, at andre tidspunkter vil være mere hensigtsmæssige, eller at de må suppleres.

Ved eksponeringsperiodens slutning aftages beskyttelsesanordningen fra hvert dyr og opbevares separat med henblik på analyse. Den behandlede hud fra alle dyr vaskes mindst tre gange med rengøringsmiddel og passende servietter. Der skal vises omhu for at undgå kontaminering af andre dele af kroppen. Rengøringsmidlet skal være repræsentativt for sædvanlig hygiejnepraksis, f.eks. sæbevand. Endelig skal huden tørres. Alle servietter og alt vaskevand opbevares med henblik på analyse. På dyr i grupperne svarende til efterfølgende tidspunkter anlægges en frisk afdækning til at beskytte det behandlede sted, hvorefter dyrene sættes tilbage i hvert sit bur.

▼B

1.4.9. **Afsluttende procedurer**

For hver gruppe aflives de enkelte dyr på det fastsatte tidspunkt, og blod opsamles til analyse. Beskyttelsesanordning eller afdækning fjernes med henblik på analyse. Huden fra påføringsstedet og et tilsvarende areal af ikke-doseret, glatraget hud fjernes fra hvert dyr til separat analyse. For at skaffe flere oplysninger om teststoffets fordeling kan påføringsstedet spaltes, så stratum corneum adskilles fra det underliggende epidermis. Fastlæggelse af denne fordelings tidsmæssige forløb efter eksponeringsperioden vil give et fingerpeg om teststoffets skæbne i stratum corneum. For at lette spaltningen af huden (efter den endelige hudvask og aflivning af dyret) fjernes hver afdækning. Huden fra påføringsstedet eksciseres fra rotten sammen med det ringformede parti af omgivende hud og hæftes op på en plade. Et stykke tape lægges på hudoverfladen med et let tryk, og tapen fjernes sammen med en del af stratum corneum. Der fortsættes med flere tapestykker, indtil tapen ikke længere hænger fast i hudoverfladen, når hele stratum corneum er fjernet. Alle tapestykker fra hvert dyr kan lægges i en enkelt beholder, som derefter tilsættes et vævsopløsende middel for at opløse stratum corneum. Alle potentielle målvæv kan fjernes med henblik på separat bestemmelse, før resten af kadaveret analyseres for absorberet dosis. Kadaveret af hvert enkelt dyr opbevares til analyse. Sædvanligvis vil analyse af det totale indhold være tilstrækkelig. Målorganer kan udtages til separat analyse (hvis det tilsiges af andre undersøgelser). Blærens indhold af urin på det planmæssige aflivningstidspunkt hældes sammen med den foregående urinopsamling. Efter at ekskreterne fra metabolismeburene på det planmæssige aflivningstidspunkt er opsamlet, vaskes burene og deres opsamlingsanordning med et passende opløsningsmiddel. Andet potentielt kontamineret udstyr analyseres ligeledes.

1.4.10. **Analyse**

I alle undersøgelser skal opnås tilstrækkelig genfinding (dvs. gennemsnitligt 100 ± 10 % af radioaktiviteten). Er genfindingen uden for dette område, skal det begrundes. Den tilførte mængde dosis i hver prøve bestemmes med behørigt validerede metoder.

I de statistiske overvejelser skal indgå et mål for variansen mellem gentagelserne for hver påføring.

2. **DATA**

Følgende målinger foretages for hvert dyr på hvert prøvetagningstidspunkt af teststoffet og/eller dets metabolitter. Foruden individuelle data angives gennemsnitsværdier for hvert prøvetagningstidspunkt.

— den mængde, der er knyttet til beskyttelsesanordningerne

— den mængde der kan fjernes fra huden

— den mængde i eller på huden, der ikke kan vaskes af huden

▼B

— mængde i de udtagne blodprøver

— mængde i ekskreter og udåndingsluft (hvis relevant)

— resterende mængde i kadaveret og eventuelle organer, der er udtaget til separat analyse.

Ud fra mængden af teststof og/eller metabolitter i ekskreter, udåndingsluft, blod og kadaver kan den totale absorberede mængde på hvert tidspunkt bestemmes. Desuden kan man beregne mængde teststof absorberet pr. cm^2 hud, der er eksponeret for teststoffet i eksponeringsperioden.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal dække de krav, der er fastsat i protokollen, herunder en begrundelse for det anvendte testsystem, og skal omfatte følgende:

Teststof:

— identifikationsdata (f.eks. CAS-nummer, hvis det foreligger, oprindelse, renhed (radiokemisk renhed), kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk form, fysiske-kemiske egenskaber (f.eks. pH, flygtighed, opløselighed, stabilitet, molekylvægt og log P_{ow}).

Testpræparat:

— formulering og begrundelse for dens anvendelse

— nærmere oplysninger om testpræparatet: anvendt mængde, opnået koncentration, bærestof, stabilitet og homogenitet.

Forsøgsdyr:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse og slutning.

Forsøgsbetingelser:

— nærmere oplysninger om administration af testpræparatet (påføringssted, assaymetoder, tillukket/ikke tillukket, volumen, ekstraktion, påvisning)

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater:

— eventuelle tegn på toksicitet

— absorptionsdata i tabelform (udtrykt som hastighed, mængde eller procentdel)

▼B

— totale genfindingsværdier i forsøget

— fortolkning af resultater, sammenholdelse med eventuelle foreliggende oplysninger om perkutan absorption af teststoffet.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5), 829-835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

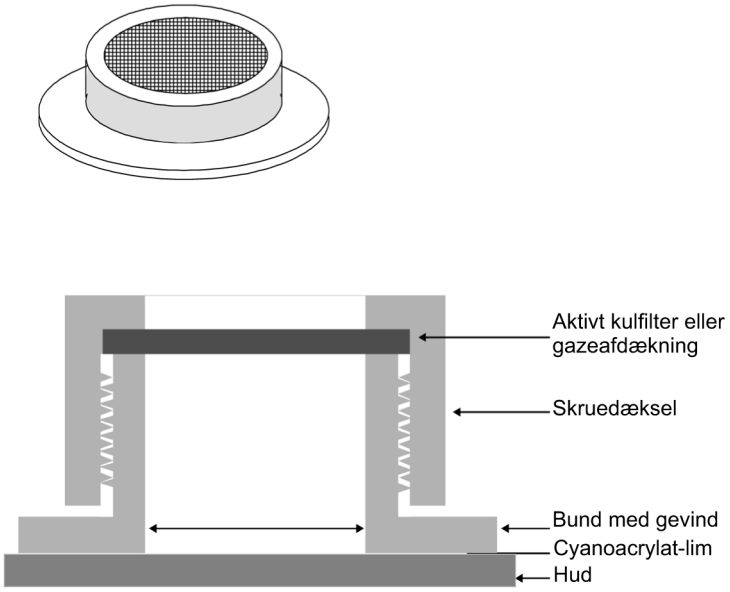
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, 369-373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54, 399-404.

▼B

Figur 1

Eksempel på typisk anordning til afgrænsning og beskyttelse af påføringsstedet på huden ved in vivo-undersøgelser af perkutan absorption



▼B

B.45. **HUDABSORPTION: IN VITRO-METODE**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 428 (2004).

1.1. INDLEDNING

Metodens formål er undersøgelse af teststoffers absorption ved påføring af disse på eksciseret hud. Den kan enten kombineres med metoden til hudabsorption in vivo (1) eller anvendes separat. Vedrørende udformningen af undersøgelser baseret på denne testmetode anbefales det at konsultere OECD's vejledning »Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies« (2). OECD's vejledning er udarbejdet for at lette valget af egnede in vitro-metoder til anvendelse under nærmere bestemte omstændigheder og derigennem sikre pålideligheden af de resultater, der fås ved brug af metoden.

Metoder til måling af hudabsorption og afgivelse til huden kan inddeles i to kategorier: in vivo og in vitro. In vivo-metoder til hudabsorptionsundersøgelser er veletablerede og giver farmakokinetiske oplysninger i en række dyrearter. En in vivo-metode er beskrevet særskilt i en anden testmetode (1). Også in vitro-metoder er i mange år blevet anvendt til måling af hudabsorption. Skønt der ikke er udført formelle valideringsundersøgelser af de in vitro-metoder, der er omfattet af denne testmetode, var OECD-eksperter i 1999 enige om, at in vitro-metoden (3) var tilstrækkeligt underbygget med evaluerede data. I vejledningen (2) underbygges metoden yderligere, bl.a. med et betydeligt antal direkte sammenligninger af in vitro- og in vivo-metoder. Emnet er gennemgået i en række monografier, hvor der detaljeret redegøres for baggrunden for anvendelse af en in vitro-metode (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Med in vitro-metoder måles diffusionen af kemiske stoffer ind i og tværs gennem hud til en væskebeholder, idet der enten kan bruges ikke-levende hud og således alene måles diffusion, eller frisk, metabolisk aktiv hud til måling af både diffusion og hudmetabolisme. Sådanne metoder har især fundet anvendelse til screening af kemiske stoffers indtrængen i og optagelse gennem hud fra forskellige formuleringer og kan desuden være nyttige som modeller ved vurdering af perkutan absorption i mennesker.

In vitro-metoden er ikke nødvendigvis anvendelig på alle situationer eller på alle klasser af kemiske stoffer. In vitro-metoden kan være brugbar til indledende kvalitativ evaluering af hudpenetration. I visse tilfælde kan det være nødvendigt efterfølgende at supplere med in vivo-data. Med henblik på nærmere fastlæggelse af situationer, hvor in vitro-metoden vil være egnet, henvises til vejledningen (2). Mere detaljerede oplysninger til støtte for denne afgørelse findes i (3).

I beskrivelsen af denne metode redegøres for generelle principper for måling af teststoffers absorption af og afgivelse til eksciseret hud. Der kan anvendes hud fra mange pattedyrarter, herunder mennesker. Hudens permeabilitetsegenskaber bevares efter ekscision fra kroppen, da den vigtigste diffusionsbarriere er det ikke-levende stratum corneum; der ikke er fundet aktiv transport af kemiske stoffer gennem huden. Skønt huden er påvist at kunne metabolisere visse kemiske stoffer under perkutan absorption (6), er processen er ikke hastighedsbegrænsende for den faktisk absorberede dosis, selv om den kan påvirke arten af de stoffer, der træder ind i blodet.

▼B

1.2. DEFINITIONER

Uabsorberet dosis: den del af dosis, der vaskes af hudoverfladen efter eksponering, og den, der findes på den ikke lukkede afdækning, samt den del, der påvises at forflygtiges fra huden under eksponeringen.

Absorberet dosis (in vitro): massen af teststof, der tilføres receptorvæsken eller det systemiske kredsløb inden for et nærmere fastlagt tidsrum.

Absorberbar dosis (in vitro): den del af dosis, der er til stede på eller i huden efter afvaskning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet, som kan være radioaktivt mærket, påføres på overfladen af en hudprøve, der danner adskillelse mellem de to kamre i en diffusionscelle. Stoffet efterlades på huden i et fastlagt tidsrum under nærmere angivne betingelser, hvorefter det fjernes med en passende rensningsmetode. Der udtages prøver af receptorvæsken på tidspunkter fordelt over hele forsøget, og prøverne analyseres for teststoffet og/eller dets metabolitter.

Anvendes metabolisk aktive systemer, kan teststoffets metabolitter analyseres med egnede metoder. Ved forsøgets slutning bestemmes den kvantitative fordeling af teststoffet og dets metabolitter, når det er relevant.

Under passende betingelser, der er beskrevet i denne metode og i vejledningen (2), måles teststoffets absorption i løbet af et givet tidsrum ved analyse af receptorvæsken og den behandlede hud. Teststof, der er tilbageblevet i huden, anses for absorberet, medmindre det kan vises at absorptionen kan bestemmes alene ud fra værdier for receptorvæsken. Efter analyse af de øvrige komponenter (materiale vasket af huden og materiale tilbageholdt i hudlagene) kan der foretages en nærmere vurdering af data, herunder teststoffets totale fordeling og genfindingsprocent.

For at godtgøre testsystemets ydeevne og pålidelighed, således som det anvendes i det pågældende laboratorium, skal der for relevante referencestoffer foreligge resultater, som udviser overensstemmelse med offentliggjort litteratur om den anvendte metode. Dette krav kan tænkes opfyldt ved test af et passende referencestof (fortrinsvis med lipofile egenskaber, der ligner teststoffets) sideløbende med teststoffet eller ved fremlæggelse af fyldestgørende historiske data for en række referencestoffer med forskellige lipofile egenskaber (f.eks. koffein, benzoesyre og testosteron).

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Diffusionscelle**

En diffusionscelle består af et donorkammer og et receptorkammer, hvorimellem huden anbringes (en typisk udformning er vist i figur 1). Cellen skal slutte tæt omkring huden og skal lette prøvetagning fra og opblanding af receptoropløsningen, som er i kontakt med undersiden af huden, og skal derudover give gode muligheder for temperaturregulering af cellen og dens indhold. Både statiske diffusionsceller og gennemstrømningsceller kan godtages. Donorkammeret er sædvanligvis utillukket under eksponering for en endelig dosis af testpræparatet, men kan være tillukket ved ubegrænsede doser og ved visse scenarier med endelig dosis.

▼B

1.4.2. **Receptorvæske**

En receptorvæske af fysiologisk karakter må foretrækkes, men også væske af anden art kan anvendes, når dette begrundes. Receptorvæskens nøjagtige sammensætning skal angives. Det skal godtgøres, at teststoffet er tilstrækkelig opløseligt i receptorvæsken, så denne ikke virker som en barriere for absorptionen. Desuden må receptorvæsken ikke påvirke hudpræparatets integritet. I gennemstrømningssystemer må gennemstrømningshastigheden ikke være sådan, at den hæmmer teststoffets diffusion til receptorvæsken. I systemer med statisk celle skal væsken være under konstant omrøring, og der skal regelmæssigt tages prøver af væsken. Undersøges metabolismen, skal receptorvæsken kunne holde huden levende under hele forsøget.

1.4.3. **Hudpræparater**

Hud fra mennesker eller dyr kan anvendes. Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser. Levende hud må foretrækkes, men også ikke-levende hud kan anvendes, forudsat at hudens integritet kan godtgøres. Såvel membraner bestående af epidermis (fraspaltet ad enzymatisk, termisk eller kemisk vej) som delhudspræparater (tykkelse typisk 200-400 μm) fremstillet med dermatom, kan godtages. Hud i fuld tykkelse kan anvendes, men for stor tykkelse (> ca. 1 mm) må undgås, medmindre det specielt er nødvendigt til bestemmelse af teststoffet i hudens forskellige lag. Den valgte art, anatomiske placering og præparationsteknik skal begrundes. Der kræves acceptable data fra mindst fire gentagelser for hvert testpræparat.

1.4.4. **Hudpræparatets integritet**

Korrekt præparation af huden er afgørende. Ved uhensigtsmæssig håndtering kan stratum corneum blive beskadiget, hvorfor integriteten af den præparerede hud må kontrolleres. Undersøges hudmetabolisme, skal huden anvendes snarest muligt efter excisionen og ved betingelser, der vides at støtte den metaboliske aktivitet. Som hovedregel skal nyeksciseret hud anvendes inden for 24 timer, men den acceptable opbevaringsperiode kan afhænge af det enzymsystem, der deltager i metaboliseringen, samt af opbevaringstemperaturen (13). For hudpræparater, der har været opbevaret inden brug, skal der forelægges dokumentation for, at barrierefunktionen er bevaret.

1.4.5. **Teststof**

Teststoffet er den enhed, hvis penetrationsegenskaber skal undersøges. Ideelt bør teststoffet være radioaktivt mærket.

1.4.6. **Testpræparat**

Testpræparatet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Enhver afvigelse fra det »ibrugværende« præparat skal begrundes.

▼B

1.4.7. **Teststoffets koncentration og formuleringer**

Normalt anvendes flere koncentrationer af teststoffet, således at overgrænsen for potentiel eksponering af mennesker er inkluderet. Tilsvarende må det overvejes at teste en række typiske formuleringer.

1.4.8. **Påføring på huden**

Når mennesker eksponeres for kemiske stoffer, er der sædvanligvis tale om endelige doser. For at påføringen skal modsvare forholdene ved eksponering af mennesker, skal der således normalt anvendes 1-5 mg/cm^2 hud for faste stoffer og indtil 10 µl/cm^2 for væsker. Mængden skal være begrundet i de forventede anvendelsesbetingelser, undersøgelsens målsætning eller testpræparatets fysiske egenskaber. F.eks. kan påføringen på hudoverfladen svare til »ubegrænset«, når der anvendes et stort volumen pr. arealenhed.

1.4.9. **Temperatur**

Kemiske stoffers passive diffusion (og dermed deres hudabsorption) er temperaturafhængig. Diffusionskammeret og huden skal holdes ved konstant temperatur tæt på den normale hudtemperatur på 32 ± 1 ^{o}C. Forskellige cellekonstruktioner kræver forskellig temperatur af vandbad eller varmeplade for at sikre, at receptor/hud er i det fysiologiske normalområde. Fugtigheden skal helst være mellem 30 og 70 %.

1.4.10. **Varighed af eksponering og prøvetagning**

Eksponeringen af huden for testpræparatet kan strække sig over hele forsøgets varighed eller over kortere tid (med henblik på efterligning af en given type human eksponering). Overskydende testpræparat vaskes af huden med et passende rengøringsmiddel, og vaskevandet opsamles til analyse. Fremgangsmåden ved fjernelse af testpræparatet bør afhænge af de forventede anvendelsesbetingelser og skal begrundes. Normalt kræves en prøvetagningsperiode på 24 timer for at få en fyldestgørende karakterisering af absorptionsprofilen. Da hudens integritet kan begynde at forringes efter 24 timer, bør prøvetagningstidspunkterne normalt ikke strække sig ud over 24 timer. Så lang en periode er ikke nødvendigvis påkrævet for teststoffer, der hurtigt trænger gennem huden, men til testning af langsomt penetrerende teststoffer kan længere tid behøves. Prøvetagning fra receptorvæsken skal ske med en frekvens, der gør det muligt at optegne en kurve over teststoffets absorptionsprofil.

1.4.11. **Afsluttende procedurer**

Alle testsystemets komponenter analyseres, og genfindingsgraden bestemmes. Det gælder donorkammer, skyllevand til hudoverflade, hudpræparat og receptorvæske/-kammer. I nogle tilfælde kan huden opdeles i det eksponerede hudareal og hudarealet under celleflangen, samt i fraktioner bestående af stratum corneum, epidermis og dermis, som analyseres hver for sig.

1.4.12. **Analyse**

I alle undersøgelser skal opnås tilstrækkelig genfinding (målet bør være et gennemsnit på 100 ± 10 % af radioaktiviteten, og eventuel afvigelse herfra skal begrundes). Teststofindhold i receptorvæske, hudpræparat, vaskevand fra hudoverfladen og skyllevand fra apparaturet bestemmes med en egnet metode.

▼B

2. **DATA**

Der redegøres for analysen af receptorvæsken, teststoffets fordeling i testsystemet, og absorptionsprofilens sammenhæng med tiden. Når der eksponeres ved betingelser svarende til en begrænset dosis, beregnes mængde vasket af huden, mængde bundet til huden (og til de forskellige hudlag, hvis disse analyseres) samt mængde i receptorvæsken (hastighed og mængde eller procentdel af påført dosis). Hudabsorption kan undertiden udtrykkes alene med receptorvæskedata. Når der er teststof tilbage i huden ved slutningen af undersøgelsen, kan det dog være nødvendigt at medregne det i den samlede absorberede mængde (se punkt 66 i henvisning (3)). Når der eksponeres med ubegrænset dosis, kan data gøre det muligt at beregne en permeabilitetskonstant (Kp). I så fald er den absorberede procentdel ikke relevant.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal dække de krav, der er fastsat i protokollen, herunder en begrundelse for det anvendte testsystem, og skal omfatte følgende:

Teststof:

— fysisk form, fysisk-kemiske egenskaber (i det mindste molekylvægt og log P_{ow}), renhed (radiokemisk renhed)

— identifikationsoplysninger (f.eks. batchnummer)

— opløselighed i receptorvæske.

Testpræparat:

— formulering og begrundelse for dens anvendelse

— homogenitet.

Forsøgsbetingelser:

— kilder og hudområde, præparationsmetode, opbevaringsbetingelser inden brug, eventuel forbehandling (rengøring, antibiotisk behandling osv.), målinger af hudintegritet, metabolisk status, begrundelse for valget

— cellens udformning, receptorvæskens sammensætning, receptorvæskens gennemstrømningshastighed eller prøvetagningstidspunkter og -metoder

— nærmere oplysninger om påføring af testpræparatet og kvantificering af den påførte dosis

— eksponeringens varighed

— nærmere beskrivelse af fjernelsen af testpræparatet fra huden, f.eks. skylning af huden

— nærmere beskrivelse af hudanalyse og eventuelle fraktioneringsteknikker, der anvendt til at vise fordelingen i huden

▼B

— metoder til vask af celle og udstyr

— assaymetoder, ekstraktionsteknikker, detektionsgrænser og validering af analysemetoder.

Resultater:

— totale genfindingsværdier i forsøget (påført dosis ≡ hudvaskevand + hud + receptorvæske + vand fra celleskylninger)

— tabeller over genfindingen i hver af disse afdelinger

— absorptionsprofil

— absorptionsdata i tabelform (udtrykt som hastighed, mængde eller procentdel).

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **REFERENCER**

(1) Testmetode B.44. Hudabsorption: in vivo-metode.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd ChemTox, 37, 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

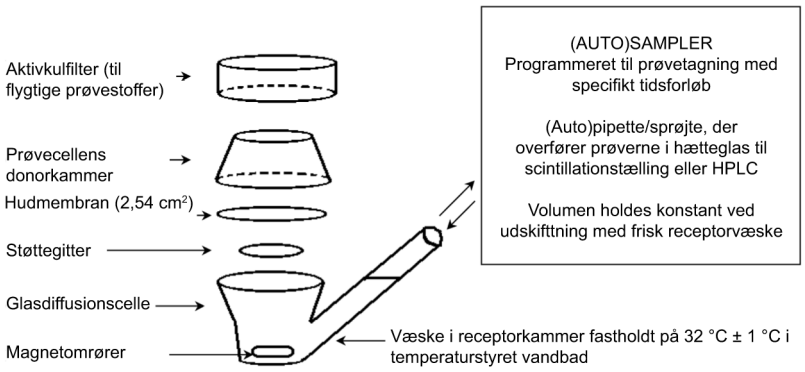
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C, Heylings, J.R., Clowes, H.M. And Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figur 1

Eksempel på typisk udformning af statisk diffusionscelle til in vitro-undersøgelse af perkutan absorption



▼M8

B.46 IN VITRO-HUDIRRITATION: FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 439 (2015). Hudirritation defineres som fremkomsten af reversible hudskader efter påføring af et testkemikalie i op til fire timer [som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS)] (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]). Denne forsøgsmetode omfatter en in vitro-procedure, som kan anvendes til fareidentifikation af irriterende kemikalier (stoffer og blandinger) i UN GHS-/CLP-kategori 2 (2). I områder, der ikke arbejder med den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer), kan denne forsøgsmetode også anvendes til at identificere ikke-klassificerede kemikalier. Derfor kan denne forsøgsmetode alt efter lovrammen og det anvendte klassificeringssystem benyttes til at bestemme kemikaliers irriterende virkning enten som en enkeltstående erstatningstest for in vivo-testning for hudirritation eller som en delvis erstatningstest inden for en teststrategi (3).

2. Vurderingen af hudirritation har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (TM B.4, som svarer til OECD TG 404, der oprindeligt blev vedtaget i 1981 og revideret i 1992, 2002 og 2015) (4). Til testning af kemikaliers ætsende virkning er tre validerede in vitro-forsøgsmetoder blevet vedtaget som EU TM B.40 (der svarer til OECD TG 430), TM B.40.A (der svarer til OECD TG 431) og TM B.65 (der svarer til OECD TG 435) (5) (6) (7). Et vejledende dokument fra OECD om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudætsning og -irritation beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations- og hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning (3).

3. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudirritation. Den er baseret på in vitro-testsystemet med rekonstrueret human epidermis (RhE), som ret nøje efterligner de biokemiske og fysiologiske egenskaber i de øvre dele af menneskehud, dvs. epidermis. I RhE-testsystemet benyttes humant afledte ikke-transformerede keratinocytter som cellekilde til rekonstruktion af en epidermal model med repræsentativ histologi og cytoarkitektur. Der findes ydeevnestandarder (PS), som letter validering og vurdering af lignende og ændrede RhE-baserede forsøgsmetoder i overensstemmelse med principperne i OECD's vejledende dokument nr. 34 (8) (9). Den tilsvarende testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2010, opdateret i 2013 for at medtage yderligere RhE-modeller og igen opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og indføre anvendelsen af en alternativ procedure til måling af levedygtighed.

4. Der er gennemført prævaliderings-, optimiserings- og valideringsundersøgelser for fire in vitro-testmodeller, der findes i handelen (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), og som er baseret på RhE-testsystemet (følsomhed 80 %, specificitet

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

▼**M8**

70 % og nøjagtighed 75 %). Disse fire testmodeller er medtaget i denne TM og står opført i tillæg 2, hvor der også findes oplysninger om den type valideringsundersøgelse, der blev anvendt til at validere de forskellige forsøgsmetoder. Som nævnt i tillæg 2 er den validerede referencemetode (VRM) blevet anvendt til at udvikle denne forsøgsmetode og ydeevnestandarderne (8).

5. OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret for testmodeller valideret i henhold til ydeevnestandarderne (8), hvis disse testmodeller er blevet gennemgået og vedtaget af OECD. De testmodeller, der er medtaget i denne forsøgsmetode og den tilhørende OECD-testvejledning, kan anvendes vilkårligt til at opfylde forskellige landes krav til testresultater for in vitro-forsøgsmetoder til vurdering af hudirritation og drager samtidig fordel af aftalen om gensidig anerkendelse af data.

6. Definitioner for de udtryk, der er anvendt i dette dokument, findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

7. Forsøgsmetoden er som påvist ved den fulde prospektive valideringsundersøgelse til vurdering og karakterisering af RhE-forsøgsmetoder (16) begrænset derved, at den ikke giver mulighed for klassificering af kemikalier i den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer) (1). Det er således lovrammen i medlemsstaterne, der afgør, hvordan denne forsøgsmetode anvendes. For EU er kategori 3 ikke taget op i CLP. For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (3). Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser.

8. Denne forsøgsmetodes endepunkt for menneskers sundhed er hudirritation. Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudætsning, men det skal bemærkes, at TM B.40.A (som svarer til OECD TG 431) om hudætsning er baseret på det samme RhE-testsystem, dog med en anden protokol (6). Denne forsøgsmetode er baseret på RhE-modeller, hvor der anvendes humane keratinocytter, som derfor in vitro repræsenterer de pågældende arters målorgan. Den omfatter endvidere direkte det indledende trin i den inflammatoriske kaskade/aktionsmekanisme (celle- og vævsbeskadigelse, der forårsager lokalt traume), som forekommer i forbindelse med in vivo-irritation. Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og databasen for valideringsundersøgelsen omfattede 58 kemikalier i alt (16) (18) (23). Forsøgsmetoden kan benyttes til test af faste stoffer, væsker, halvfaste stoffer og voks. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (29). Selv om det er tænkeligt, at gasser og aerosoler kan undersøges ved hjælp af RhE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode det ikke.

9. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Da blandinger imidlertid omfatter et vidt spektrum af kategorier og sammensætninger, og da der for øjeblikket kun foreligger begrænsede oplysninger om testning af blandinger, bør forsøgsmetoden i de tilfælde, hvor det kan påvises, at den

▼**M8**

ikke er egnet til en specifik kategori af blandinger (f.eks. efter en strategi som fremsat i Eskes et al., 2012) (30), ikke anvendes til forsøg med denne specifikke kategori af blandinger. Der skal udvises tilsvarende omhu, såfremt specifikke kemiske grupper eller fysisk-kemiske egenskaber viser sig ikke at være kompatible med forsøgsmetoden.

10. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan, og testkemikalier, som direkte kan reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan interferere med målinger af cellelevedygtighed og kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner (jf. punkt 28-34).

11. En analyseserie bestående af tre vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringen er entydig. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger, og/eller hvis den gennemsnitlige levedygtighed er 50 ± 5 %, bør det overvejes at gennemføre en anden analyseserie samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier er diskordante.

PRINCIP FOR TESTEN

12. Testkemikaliet påføres på en tredimensional RhE-model, som består af ikke-transformerede humant afledte epidermiskeratinocytter, som ved dyrkning har dannet en stærkt differentieret flerlagsmodel af den humane epidermis. Den består af velordnede basallag, stratum spinosum og stratum granulosum og et flerlaget stratum corneum med intercellulære lamellære lipidlag fra samme lipidklasser som dem, man finder in vivo.

13. Kemikalieinduceret hudirritation, primært i form af erythem og ødem, er resultatet af en kaskade af begivenheder, der indledes med kemikaliernes gennemtrængning af stratum corneum, hvor de kan beskadige de underliggende keratinocytlag og andre hudceller. De beskadigede celler kan enten frigive inflammatoriske mediatorer eller inducere en inflammatorisk kaskade, som også påvirker cellerne i dermis, navnlig de stromale og endotele celler i blodkarrene. Det er dilatationen og den øgede permeabilitet i de endotele celler, der skaber det observerede erythem og ødem (29). Da der ikke er nogen vaskularisering i in vitro-testsystemet, måler de RhE-baserede forsøgsmetoder de indledende begivenheder i kaskaden, f.eks. celle-/vævsbeskadigelsen (16) (17), og bruger cellelevedygtigheden som indikator.

14. Cellernes levedygtighed i RhE-modeller måles ved, at enzym omdanner vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt; CAS-nummer 298-93-1] til et blåt formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (31). Irriterende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellernes levedygtighed til under en bestemt tærskelværdi (dvs. ≤ 50 % for UN GHS-/CLP-kategori 2). Afhængigt af lovgivningsrammen og forsøgsmetodens anvendelighed kan testkemikalier, der fører til en cellelevedygtighed, som ligger over den fastlagte tærskelværdi, betragtes som ikke-irriterende stoffer (dvs. > 50 %, "ingen kategori").

▼M8

PÅVISNING AF KOMPETENCE

15. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en eller flere af de fire validerede testmodeller, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode (tillæg 2), bør de påvise deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der står opført i tabel 1. I situationer, hvor et stof på listen f.eks. ikke kan fås, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (8)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1. Anvendelse af alternative kompetencestoffer skal begrundes.

16. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugerne kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af fabrikanten af RhE-modellen. Det er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lang afstand/lange perioder. Når en forsøgsmetode er blevet helt fastlagt, og kompetencen med hensyn til brugen heraf er erhvervet og påvist, er det ikke nødvendigt at kontrollere disse egenskaber rutinemæssigt. Ved rutinemæssig brug af en forsøgsmetode anbefales det imidlertid at kontrollere barriereegenskaberne med jævne mellemrum.

Tabel 1

Kompetencestoffer ([1])

Stof	CAS-nr.	In vivo-score ([2])	Fysisk tilstand	UN GHS-kategori
IKKE-KLASSIFICEREDE STOFFER (UN GHS "ingen kategori")				
naphthaleneddikesyre	86-87-3	0	Fast	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Flydende	Ingen kat.
methylstearat	112-61-8	1	Fast	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Flydende	Ingen kat. (*valgfri kat. 3*) ([3])
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Flydende	Ingen kat. (*valgfri kat. 3*) ([3])
KLASSIFICEREDE STOFFER (UN GHS-kategori 2)				
cyclamenaldehyd	103-95-7	2,3	Flydende	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Flydende	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Flydende	Kat. 2
1-methyl-3-phenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fast	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Flydende	Kat. 2

([1]) Kompetencestofferne er en undergruppe af de stoffer, der anvendes i valideringsundersøgelsen, og udvælgelsen er baseret på følgende kriterier: i) De kemiske stoffer findes i handelen, ii) de er repræsentative for det fulde interval af Draize-irritationsscorer (fra ikke-irriterende til stærkt irriterende), iii) de har en veldefineret kemisk struktur, iv) de er repræsentative for den kemiske funktionalitet, der blev anvendt i valideringsprocessen, v) de gav reproducerbare in vitro-resultater i flere forsøg og flere laboratorier, vi) deres forudsigelighed in vitro var korrekt, og vii) de er ikke forbundet med nogen ekstremt toksisk profil (f.eks. carcinogene eller toksiske for reproduktionssystemet) og heller ikke med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger.

([2]) In vivo-score i overensstemmelse med TM B.4 (4).

([3]) I denne forsøgsmetode betragtes kemikalier i den valgfrie UN GHS-kategori 3 (mildt irriterende stoffer) (1) som tilhørende "ingen kategori".

▼M8

FREMGANGSMÅDE

17. Nedenfor følger en beskrivelse af komponenter og procedurer i en RhE-forsøgsmetode til vurdering af hudirritation (se også tillæg 3 for parametre vedrørende de forskellige testmodeller). Der findes standardprocedurer (SOP'er) for de fire modeller, der er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode (32) (33) (34) (35).

KOMPONENTER I RHE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

18. Der skal anvendes ikke-transformerede humane keratinocytter til at rekonstruere epithel. Der bør være flere lag af levedygtige epithelceller (basallag, stratum spinosum, stratum granulosum) til stede under et fungerende stratum corneum. Stratum corneum bør være flerlaget og have den lipidprofil, der gør den til en effektiv barriere, som kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske referencekemikalier, f.eks. natriumdodecylsulphat (SDS) eller Triton X-100. Barrierefunktionen bør påvises og kan vurderes enten ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC_{50}) efter en fast eksponeringstid, eller ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at reducere cellernes levedygtighed med 50 % (ET_{50}), når referencekemikaliet påføres i en nærmere angivet fast koncentration. RhE-modellens fysiske udformning bør forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv, hvilket ville forringe modelleringen af hudens eksponering. RhE-modellen skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

19. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af levedygtigheden (31). Levedygtige celler i RhE-modellen kan reducere vitalfarvestoffet MTT til blåt MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelse af isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). Det rene ekstraktionsmiddels optiske tæthed (OD) skal være tilstrækkelig lav, dvs. OD < 0,1. Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres enten ved måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (36). Brugerne af RhE-modellen bør sikre, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen fastsætter et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (i betingelserne for forsøgsmetoden til vurdering af hudirritation). Intervallerne for de fire validerede RhE-modeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, er anført i tabel 2. En bruger af HPLC-/UPLC-spektrofotometri bør anvende de OD-intervaller for negativ kontrol, der er anført i tabel 2, som acceptkriterier for den negative kontrol. Det skal godtgøres, at det væv, der er behandlet med det negative kontrolstof, har stabil kultur (giver enslydende levedygtighedsmålinger) i hele testeksponeringsperioden.

Tabel 2

Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol for de testmodeller, der er omfattet af denne TM

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barrierefunktion

20. Stratum corneum og dets lipidsammensætning bør være tilstrækkelig til at modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske referencekemikalier (f.eks. SDS eller Triton X-100), bestemt ved IC_{50} eller ET_{50} (tabel 3).

Morfologi

21. Der bør forelægges en histologisk undersøgelse af RhE-modellen, som dokumenterer dens human epidermis-lignende struktur (herunder flerlaget stratum corneum).

Reproducerbarhed

22. Resultaterne af forsøgsmetodens positive og negative kontroller skal udvise reproducerbarhed over tid.

Kvalitetskontrol (QC)

23. RhE-modellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 19), barrierefunktion (punkt 20) og morfologi (punkt 21) er de vigtigste. Brugerne af forsøgsmetoden bør have adgang til disse data, således at de kan medtage disse oplysninger i testrapporten. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen bør fastsætte et acceptinterval (øvre og nedre grænse) for IC_{50} eller ET_{50}. Kun resultater, der er fremkommet med kvalificerede væv, kan accepteres til at forudsige irriterende stoffers klassificering på pålidelig vis. Acceptintervallerne for de fire testmodeller, der er omfattet af denne TM, er anført i tabel 3.

Tabel 3

QC-batchgodkendelseskriterier for de testmodeller, der er omfattet af denne TM

	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiSkin™ (SM) (behandling i 18 timer med SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 t	ET_{50} = 8,7 t
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 t	ET_{50} = 10,0 t
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (behandling i 18 timer med SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Påføring af testkemikaliet og kontrolkemikalier

24. Der anvendes mindst tre vævsprøver for hvert testkemikalie og hver kontrol pr. analyseserie. For både flydende og faste kemikalier gælder det, at der skal påføres tilstrækkelig meget testkemikalie til, at epidermisoverfladen dækkes med et jævnt lag, samtidig med at ubegrænsede doser undgås, dvs. mellem 26 og 83 µl/cm^2 eller mg/cm^2 (jf. tillæg 3). I tilfælde af faste kemikalier fugtes epidermisoverfladen med deioniseret eller destilleret vand inden påføringen for at forbedre kontakten mellem testkemikaliet og epidermisoverfladen. Faste stoffer bør testes som fint pulver, når det overhovedet er muligt. I nogle tilfælde kan der anvendes et nylonnet til at hjælpe med at sprede kemikaliet (jf. tillæg 3). Efter eksponeringsperioden vaskes testkemikaliet omhyggeligt af epidermisoverfladen med en vandig buffer eller 0,9 % NaCl. Alt efter de anvendte RhE-testmodeller er eksponeringstiden på mellem 15 og 60 minutter, og inkubationstemperaturen mellem 20 og 37 °C. Disse eksponeringsperioder og -temperaturer optimeres for hver enkelt RhE-forsøgsmetode og repræsenterer testmodellernes forskellige iboende egenskaber (f.eks. barrierefunktion) (jf. tillæg 3).

25. Der skal i hver analyseserie anvendes sideløbende negative (NC) og positive (PC) kontroller, så det påvises, at levedygtigheden (med NC), barrierefunktionen og vævets deraf følgende følsomhed (med PC) ligger inden for et forud fastsat acceptinterval. Som positivt kontrolstof foreslås 5 % vandig SDS. Som negativt kontrolstof foreslås enten vand eller phosphatbufferet saltopløsning (PBS).

Måling af cellelevedygtighed

26. Ifølge testproceduren er det vigtigt, at levedygtigheden ikke måles umiddelbart efter eksponeringen for testkemikaliet, men først efter en tilstrækkelig lang inkubationsperiode efter behandlingen, hvor det renskyllede væv inkuberes i frisk medium. En sådan periode betyder, dels at vævet kan komme sig over svagt cytotoksiske virkninger, dels at eventuelle cytotoksiske virkninger træder tydeligt frem. En inkubationsperiode efter behandling på 42 timer blev fundet optimal under testoptimeringen for to af de RhE-baserede testmodeller, der ligger til grund for denne forsøgsmetode (11) (12) (13) (14) (15).

27. MTT-assayet er en valideret kvantitativ metode, som skal benyttes til måling af cellelevedygtigheden i forbindelse med denne forsøgsmetode. Den er forenelig med brug i en tredimensional vævsmodel. Vævsprøven anbringes i en MTT-opløsning af passende koncentration (f.eks. 0,3-1 mg/ml) i tre timer. MTT omdannes til blåt formazan af de levedygtige celler. Det udfældede blå formazan ekstraheres fra vævet med et opløsningsmiddel (f.eks. isopropanol eller sur isopropanol), og formazankoncentrationen måles ved bestemmelse af OD ved 570 nm i et højst ± 30 nm bredt filterbånd eller ved en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 34) (36).

28. Testkemikaliets optiske egenskaber eller dets kemiske reaktion med MTT (kemikalierne kan f.eks. standse, mindske eller forårsage farvedannelsen) kan interferere med målingen og føre til et forkert skøn over levedygtigheden. Det kan forekomme, hvis et specifikt testkemikalie ikke bliver fjernet fuldstændigt fra vævet ved skylning, eller hvis det er trængt ned i epidermis. Hvis et testkemikalie reagerer direkte med MTT (f.eks. MTT-reduktionsmidler), hvis det selv er farvet, eller hvis det bliver farvet

▼M8

under behandlingen af vævet, bør der anvendes yderligere kontroller til at påvise og korrigere for testkemikaliets interferens med levedygtighedsmålingen (jf. punkt 29 og 33). Det er nærmere beskrevet, hvordan der korrigeres for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens, i SOP'erne for de fire validerede modeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode (32) (33) (34) (35).

29. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til en frisklavet MTT-opløsning. Hvis MTT-blandingen, når den indeholder testkemikaliet, bliver blå/violet, formodes testkemikaliet at reducere MTT direkte, og der bør udføres yderligere funktionsmæssig kontrol på ikke-levedygtigt RhE-væv, uanset om der anvendes måling af standardabsorbans (OD) eller en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure. Ved denne yderligere funktionsmæssige kontrol anvendes dødt væv, som kun har metabolisk residualaktivitet, men absorberer testkemikaliet på samme måde som levedygtigt væv. Hvert MTT-reducerende testkemikalie påføres på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren for at generere en ikke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) (32) (33) (34) (35). En enkelt NSMTT-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyseserier der udføres. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for MTT-reduktionsmiddel minus procenten for ikke-specifik MTT-reduktion opnået med dødt væv eksponeret for det samme MTT-reduktionsmiddel, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT).

30. For at identificere potentiel interferens fra farvede testkemikalier eller testkemikalier, der bliver farvet, når de kommer i kontakt med vand eller isopropanol, og afgøre, om der skal iværksættes yderligere kontrol, bør der foretages spektralanalyse af testkemikaliet i vand (miljø under eksponering) og/eller isopropanol (ekstraktionsopløsning). Hvis testkemikaliet i vand og/eller isopropanol absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm, bør der foretages yderligere kontroller med farvestof, eller der kan anvendes en HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure, i hvilket tilfælde disse kontroller ikke er nødvendige (jf. punkt 33 og 34). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende farvet testkemikalie på mindst to levedygtige vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen bør udføres sideløbende med testningen af det farvede testkemikalie, og i tilfælde af flere test bør der foretages en uafhængig NSC_{living}-kontrol for hver test, der udføres (i hver analyseserie) på grund af den iboende biologiske variabilitet i levende væv. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning minus procenten for ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT foretaget sideløbende med den test, der korrigeres (%NSC_{living}).

31. Testkemikalier, der identificeres som fremkaldende både direkte MTT-reduktion (jf. punkt 29) og farveinterferens (jf. punkt 30), vil også kræve en tredje kontrol ud over NSMTT- og NSC_{living}-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor, når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD). Dette er sædvanligvis tilfældet med mørke testkemikalier, der interfererer med MTT-assayet (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt

▼**M8**

29. Disse testkemikalier kan binde sig til både levende og dødt væv, og derfor kan NSMTT-kontrollen ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliet binder sig til dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC_{living}-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliet binder sig til levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektion for farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSC_{killed}). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliet på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med medium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC_{killed}-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyseserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og om muligt med den samme vævsbatch. Derefter beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliet minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procenten for ikke-specifik farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT, set i forhold til den negative kontrol, som køres sideløbende med den test, der korrigeres (% NSC_{killed}).

32. Det er vigtigt at bemærke, at ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge de aflæste værdier for vævsekstraktet til over spektrofotometrets linearitetsinterval. På denne baggrund bør laboratorierne fastlægge linearitetsintervallet for deres spektrofotometer med MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7), der er købt i handelen, inden de begynder at undersøge testkemikalier i lovgivningsøjemed. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er egnet til at vurdere direkte MTT-reduktionsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliet uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval, eller når den ikke-korrigerede levedygtighedsprocent opnået med testkemikaliet allerede er $\leq$ 50 %. Ikke desto mindre bør resultaterne for testkemikalier, som fremkalder %NSMTT og/eller %NSC_{living} $\geq$ 50 % af den negative kontrol, tages med forsigtighed, da dette er den tærskelværdi, der anvendes til at skelne mellem klassificerede og ikke-klassificerede kemikalier (jf. punkt 36).

33. For farvede testkemikalier, som ikke er kompatible med måling af standardabsorbans (OD) som følge af deres for kraftige interferens i MTT-assayet, kan den alternative HPLC-/UPLC-spektrofotometriprocedure til måling af MTT-formazan anvendes (jf. punkt 34) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra testkemikaliet før kvantificering (36). Af denne grund kræves NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør dog benyttes, hvis testkemikaliet mistænkes for at være direkte MTT-reducerende eller har en farve, som forhindrer vurderingen af dets evne til direkte at reducere MTT (som beskrevet i punkt 29). Ved benyttelse af HPLC-/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes procenten for vævslevedygtighed som procentdelen af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikaliet, set i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der er direkte MTT-reducerende, beregnes den faktiske vævslevedygtighed som procenten for vævslevedygtighed opnået med levende væv

▼M8

eksponeret for testkemikaliet minus %NSMTT. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-reduktionsmidler, der også kan være farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så kraftigt, at de fører til OD-værdier (ved måling af standard-OD) eller toparealer (ved UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, der falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes, skønt dette kun forventes at forekomme i meget sjældne situationer.

34. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan også anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-reducerende og ikke-MTT-reducerende) til måling af MTT-formazan (36). Da der findes mange forskellige HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemer, bør HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemets kvalificering påvises før anvendelsen heraf til at kvantificere MTT-formazan fra vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne for en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien for bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (36) (37). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 4. Når acceptkriterierne i tillæg 4 er opfyldt, anses HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

35. For hver forsøgsmetode med gyldige RhE-modelbatcher (jf. punkt 23) bør væv, der er behandlet med negativt kontrolstof, give OD-resultater, der afspejler kvaliteten af de væv, der har været underkastet alle forsendelses- og modtagelsestrin og alle protokolprocesser. OD-værdierne af kontrollerne bør ikke være lavere end forud fastsatte nedre grænser. Tilsvarende bør væv, der er behandlet med PC, dvs. 5 % vandig SDS, afspejle vævenes evne til at reagere på et irriterende kemikalie under betingelserne for forsøgsmetoden (se tillæg 3 og for yderligere oplysninger SOP'erne for de fire testmodeller, der er omfattet af denne TG (32) (33) (34) (35)). Tilknyttede og egnede målinger af variabiliteten mellem vævsprøver, dvs. standardafvigelser (SD), bør ligge inden for de acceptgrænser, der er fastsat for den anvendte testmodel (jf. tillæg 3).

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

36. De OD-værdier, der opnås med hvert testkemikalie, kan anvendes til beregning af den procentvise levedygtighed normaliseret efter den negative kontrol, som sættes til 100 %. Hvis der benyttes HPLC-/UPLC-spektrofotometri, beregnes procenten for vævslevedygtighed som procenten af toparealet for MTT-formazan opnået med levende væv, som eksponeres for testkemikaliet, i forhold til toparealet for MTT-formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. Den tærskelværdi for cellelevedygtighedsprocent, som adskiller irriterende testkemikalier fra ikke-klassificerede testkemikalier, og de statistiske procedurer, der benyttes til at vurdere resultaterne og udpege irriterende kemikalier, bør være klart defineret og dokumenteret, og det bør være bevist, at de er hensigtsmæssige (se SOP'erne for testmodellerne for oplysninger). Tærskelværdierne for forudsigelse af den irriterende virkning er vist nedenfor:

▼M8

— Et testkemikalie identificeres som krævende klassificering og mærkning i overensstemmelse med UN GHS/CLP (kategori 2 eller kategori 1), hvis den gennemsnitlige vævslevedygtighedsprocent efter eksponering og inkubation efter behandling er mindre end eller lig med (≤) 50 %. Eftersom de RhE-testmodeller, der er omfattet af denne forsøgsmetode, ikke kan skelne mellem UN GHS-/CLP-kategori 1 og 2, skal der fremskaffes yderligere oplysninger om hudætsning, inden testkemikalierne kan klassificeres definitivt [se også OECD's vejledende dokument om IATA (3)]. Såfremt testkemikaliet betragtes som værende ikke-ætsende (baseret på TM B.40, B.40.A eller B.65) og udviser en vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter behandling på mindre end eller lig med (≤) 50 %, anses testkemikaliet for at være hudirriterende i overensstemmelse med UN GHS-/CLP-kategori 2.

— Afhængigt af medlemsstaternes lovgivningsrammer kan testkemikaliet betragtes som værende ikke-hudirriterende i overensstemmelse med UN GHS/CLP "ingen kategori", hvis vævslevedygtigheden efter eksponering og inkubation efter behandling er større end (>) 50 %.

DATA OG RAPPORTERING

Data

37. For hver analyseserie skal data fra de enkelte vævsprøver (f.eks. OD-værdier og beregnet cellelevedygtighedsprocent for hvert testkemikalie samt klassificeringen) fremlægges i tabelform, herunder data fra eventuelle gentagelser af forsøget. Desuden skal gennemsnit og eventuel standardafvigelse angives for hver analyseserie. For hvert testkemikalie fremlægges de iagttagne interaktioner med MTT-reagenset og farvede testkemikalier.

Testrapport

38. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolkemikalier:

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

— fysisk udseende, vandopløselighed og eventuelle yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— oprindelse, evt. batchnummer

— eventuel behandling af testkemikaliet/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt

— opbevaringsforhold.

Anvendt RhE-model og protokol (og eventuelt begrundelse herfor)

▼**M8**

Testbetingelser:

— anvendt RhE-model (herunder batchnummer)

— kalibreringsoplysninger for måleudstyr (f.eks. spektrofotometer), bølgelængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval - beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan

— eventuelt beskrivelse af kvalificeringen af HPLC-/UPLC-spektrofotometrisystemet - komplet dokumentation for den anvendte RhE-model, herunder om dens ydeevne. Der bør bl.a. gives oplysning om:

i) levedygtighed

ii) barrierefunktion

iii) morfologi

iv) reproducerbarhed og forudsigelsesevne

v) kvalitetskontroller (QC) af modellen

— reference til historiske data for modellen. Der bør bl.a. gives oplysning om, hvorvidt QC-dataene kan accepteres, sammenlignet med historiske batchdata

— påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencestofferne.

Testprocedure:

— detaljer om den anvendte testprocedure (herunder anvendte vaskeprocedurer efter eksponering) - anvendt dosis af testkemikalie og kontrolkemikalier

— eksponeringsvarighed og -temperatur og inkubationsperiode efter eksponering

— eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier

— antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (PC, negativ kontrol, NSMTT, NSC_{living} og NSC_{killed}, hvis relevant)

— beskrivelse af beslutningskriterier/forudsigelsesmodel baseret på den anvendte RhE-model

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden (herunder vaskeprocedurer).

Acceptkriterier for analyseserier og test:

— middelværdier for positive og negative kontroller og acceptintervaller på grundlag af historiske data - acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol

▼M8

— acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliet.

Resultater:

— angivelse i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie, hver analyseserie og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent og standardafvigelse

— eventuelle resultater af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvende testkemikalier, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standardafvigelse, endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent

— resultater opnået med testkemikaliet/-kemikalierne og kontrolkemikalierne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the »Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards«, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.

(5) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: Transkutan elektrisk modstand (TER).

(6) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis (RhE).

(7) Kapitel B.65 i dette bilag, In vitro-membranbarriereforsøgsmetode.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. og Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. og Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. og Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. og Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. og Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. og Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. og Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. og Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. og Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Disse er de oprindelige PS'er, der blev anvendt til validering af to forsøgsmetoder. Disse PS'er bør ikke længere anvendes, da der nu foreligger en opdateret version (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. og Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334.

(25) Katoh, M. og Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122.

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. og Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. og Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul. *Toxicol*. Pharmacol. 62, 393-403.

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model »LabCyte EPI-MODEL24«.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., og McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuskript under udarbejdelse.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Tilgængelig på: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., og Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, s. 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Dette er den aktuelle version af ECVAM's PS'er, opdateret i 2009 med henblik på gennemførelsen af UN GHS. Disse PS'er bør ikke længere anvendes, da der nu foreligger en opdateret version (8) for denne TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (9).

Cellelevedygtighed: en parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation, f.eks. udtrykt ved de cellulære mitochondriedehydrogenasers evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt], og som, afhængigt af det valgte endepunkt og testens udformning, korrelerer med det totale antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: et mål for ydeevnen af testmodeller, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (9).

ET_{50}: kan bedømmes ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte cellernes levedygtighed med 50 % ved påføring af referencekemikaliet i en nærmere angivet fast koncentration, se også IC_{50}.

GHS (De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtryksvæskekromatografi)

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

IC_{50}: kan bedømmes ved at bestemme den koncentration, ved hvilken et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % (IC_{50}) efter en fast eksponeringstid, se også ET_{50}.

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på epidermis ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epidermisoverfladen på ensartet måde.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

▼M8

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazoliumbromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NSC_{killed}: ikke-specifik farve i dødt væv.

NSC_{living}: ikke-specifik farve i levende væv.

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

Ydeevnestandarder (PS): standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De omfatter bl.a. i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det bør påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (9).

PC: positiv kontrol, et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (9).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (9).

Erstatningstest: en test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier (9).

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en PC.

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

▼**M8**

In vivo-hudirritation: fremkaldelse af reversibel skade på huden ved påføring af et testkemikalie i indtil 4 timer. Hudirritation er en lokalt fremkaldt reaktion i det berørte hudvæv og indtræder kort tid efter stimuleringen (38). Den fremkaldes som følge af en lokal inflammatorisk reaktion, der involverer hudvævets medfødte (ikke-specifikke) immunsystem. Den karakteriseres især ved, at den reversible proces indebærer inflammatoriske reaktioner og de fleste af de karakteristiske kliniske tegn på irritation (erythem, ødem, kløe og smerte), der er knyttet til en inflammatorisk proces.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskekromatografi).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼**M8**

Tillæg 2

TESTMODELLER, DER ER OMFATTET AF DENNE FORSØGSMETODE

Nr.	Testmodellens betegnelse	Type valideringsundersøgelse	Henvisninger
1	EpiSkin™	Fuld prospektiv valideringsundersøgelse (2003-2007). Denne models komponenter blev brugt til at fastlægge de centrale komponenter i forsøgsmetoden i de oprindelige og opdaterede PS'er fra ECVAM (39) (40) (21) (*). Derudover dannede metodens data vedrørende identificering af ikke-klassificerede og klassificerede stoffer det primære grundlag for fastlæggelsen af specificitets- og følsomhedsværdierne i de oprindelige PS'er (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*original*): Oprindeligt var denne testmodel omfattet af den fulde prospektive valideringsundersøgelse sammen med nr. 1 fra 2003-2007. Denne models komponenter blev brugt til at fastlægge de centrale komponenter i forsøgsmetoden i de oprindelige og opdaterede PS'er fra ECVAM (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** En ændring af den originale EpiDerm™ blev valideret ved anvendelse af de oprindelige PS'er fra ECVAM (21) i 2008 (*).	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Valideringsundersøgelse baseret på de oprindelige ECVAM-ydeevnestandarder (21) i 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Valideringsundersøgelse (2011-2012) baseret på ydeevnestandarderne (PS) i OECD TG 439 (8), som er baseret på de opdaterede PS'er fra ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) og PS'erne i denne TG (8) (*).

(*) De oprindelige ECVAM-ydeevnestandarder (PS) (21) blev fastlagt i 2007 efter afslutning af den prospektive valideringsundersøgelse (16), som vurderede ydeevnen af testmodel nr. 1 og 2 ud fra klassificeringssystemet som beskrevet i den 28. tilpasning af EU's direktiv om farlige stoffer (41). I 2008 blev UN GHS (1) og EU CLP indført, hvorved tærskelværdien for skelnen mellem ikke-klassificerede og klassificerede stoffer effektivt blev ændret fra en in vivo-score på 2,0 til 2,3. Som følge af dette ændrede lovkrav blev nøjagtighedsværdierne og ECVAM's PS-liste over referencekemikalier opdateret i 2009 (2) (39) (40). Som de oprindelige PS'er var også de opdaterede PS'er i vid udstrækning baseret på data fra model nr. 1 og 2 (16), men derudover blev der anvendt data om referencekemikalier fra model nr. 3. I 2010 blev ECVAM's opdaterede PS'er anvendt til at fastlægge PS'erne til denne testvejledning (8). I forbindelse med denne forsøgsmetode opfattes EpiSkin™-modellen som VRM, da den blev brugt til at opstille samtlige kriterier i PS'erne. Der findes nærmere oplysninger om valideringsundersøgelserne, en samling af de genererede data samt baggrunden for de nødvendige PS-tilpasninger som følge af gennemførelsen af UN GHS/CLP i ECVAM/BfR's forklarende baggrundsdokument til den tilsvarende OECD TG 439 (23).

SIT: Hudirritationstest.

RHE: Rekonstrueret human epidermis.

▼**M8**

Tillæg 3

SPECIFIKKE PROTOKOLPARAMETRE FOR HVER ENKELT TESTMODEL, DER ER OMFATTET AF DENNE FORSØGSMETODE

Der er store ligheder mellem RhE-modellernes protokoller, og de bruger bl.a. alle en postinkubationsperiode på 42 timer (32) (33) (34) (35). Forskellene vedrører primært tre parametre vedrørende testmodellernes forskellige barrierefunktioner og er anført nedenfor: A) tid og volumen inden inkubation, B) påføring af testkemikalier og C) volumen efter inkubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Inden inkubation				
Inkubationstid	18-24 timer	18-24 timer	< 2 timer	15-30 timer
Mediumvolumen	2 ml	0,9 ml	0,3 eller 1 ml	0,5 ml
B) Påføring af testkemikaliet				
For væsker	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
For faste stoffer	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Brug af nylonnet	Ikke anvendt	Hvis nødvendigt	Anvendt	Ikke anvendt
Påføringstid i alt	15 minutter	60 minutter	42 minutter	15 minutter
Påføringstemperatur	RT	a) ved RT i 25 minutter b) ved 37°C i 35 minutter	RT	RT
C) Volumen efter inkubation				
Mediumvolumen	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Maksimal acceptabel forskel				
Standardafvigelse mellem vævsprøver	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: stuetemperatur.
DW: destilleret vand.
DPBS: Dulbeccos phosphatbufferede saltopløsning.

▼**M8**

Tillæg 4

NØGLEPARAMETRE OG ACCEPTKRITERIER FOR KVALIFICERING AF ET HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRISYSTEM TIL MÅLING AF MTT-FORMAZAN EKSTRAHERET FRA RHE-VÆV

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (36) (37)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, "living blank" (isopropanolekstrakt fra levende RhE-væv uden behandling), "dead blank" (isopropanolekstrakt fra dødt RhE-væv uden behandling)	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$ ([1])
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Matrixvirkning	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=5)	85 % ≤ matrixvirkning i % ≤ 115 %
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ ([2]) standard	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: %Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Reproducerbarhed (over flere dage)	Dag 1: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 2: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 3: En kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	Kvalitetskontroller: %Dev ≤ 15 % og CV ≤ 15 %
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	%Dev ≤ 15 %
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved en bestemt temperatur (f.eks. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller, dvs. 200 µg/ml.

▼M7

B.47. FORSØGSMETODE TIL PÅVISNING AF OKSECORNEA-UKLARHED OG -PERMEABILITET TIL IDENTIFIKATION AF I) KEMIKALIER, DER MEDFØRER ALVORLIG ØJENSKADE, OG II) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIG ØJENSKADE

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 437 (2013). Forsøgsmetoden til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) blev evalueret af Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) i 2006 og 2010 (1) (2). I den første evaluering blev BCOP-forsøgsmetoden evalueret med henblik på at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (1). I den anden evaluering blev BCOP-forsøgsmetoden evalueret med henblik på at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der ikke er klassificeret som forårsagende øjenirritation eller alvorlig øjenskade (2). BCOP-valideringsdatabasen indeholdt i alt 113 stoffer og 100 blandinger (2) (3). Ud fra disse evalueringer og deres peer reviews blev det konkluderet, at forsøgsmetoden på korrekt vis såvel kan anvendes til at identificere kemikalier (både stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (kategori 1), som dem, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade som defineret ved De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (4) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]), og den blev derfor anerkendt som videnskabeligt gyldig til begge formål. Alvorlig øjenskade er frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Testkemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, er klassificeret som UN GHS-kategori 1. Kemikalier, der ikke klassificeres som forårsagende øjenirritation eller alvorlig øjenskade, defineres på samme måde som de kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. de betegnes som UN GHS uden for kategori. Forsøgsmetoden omfatter den anbefalede anvendelse og begrænsninger af BCOP-forsøgsmetoden baseret på dens evalueringer. De vigtigste forskelle mellem den oprindelige udgave fra 2009 og den opdaterede udgave fra 2013 af OECD's vejledning (Test Guideline) omfatter, men er ikke begrænset til: anvendelse af BCOP-forsøgsmetoden til at identificere kemikalier, der ikke kræver UN GHS-klassificering (punkt 2 og 7), præcisering af anvendelsen af BCOP-forsøgsmetoden til test af alkoholer, ketoner og faste stoffer (punkt 6 og 7) og af stoffer og blandinger (punkt 8), præcisering af, hvordan overfladeaktive stoffer og blandinger, som indeholder overfladeaktive stoffer, testes (punkt 28), ajourføringer og præciseringer af de positive kontroller (punkt 39 og 40), en opdatering af beslutningskriterierne for BCOP-forsøgsmetoden (punkt 47), ajourføring af undersøgelsesacceptkriterier (punkt 48), ajourføring af testrapportens elementer (punkt 49), ajourføring af tillæg 1 om definitioner, tilføjelse af tillæg 2 om BCOP-forsøgsmetodens forudsigelsesevne efter forskellige klassifikationssystemer, ajourføring af tillæg 3 på listen over kompetencekemikalier og ajourføring af tillæg 4 om BCOP-corneaholderen (punkt 1) og opacitometeret (punkt 2 og 3).

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M7

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-øjenirritationstest, der vil kunne erstatte in vivo-Draize-øjentesten til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Imidlertid vil strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi muligvis kunne erstatte Draize-øjentesten (5). Top-down-tilgangen (5) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ventes at have et højt irritationspotentiale, mens bottom-up-tilgangen (5) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til, at der kræves en klassificering. BCOP-forsøgsmetoden er en *in vitro*-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger for klassificering af risikoen for øjenskader og mærkning af kemikalier. Selv om den ikke betragtes som en gyldig enkeltstående erstatning for *in vivo*- kaninøjentesten, anbefales BCOP-forsøgsmetoden som første trin i en teststrategi, såsom top-down-tilgangen som anført af Scott *et al.* (5), til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test (4). BCOP-forsøgsmetoden anbefales også til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, som defineret i UN GHS (UN GHS uden for kategori) (4) i en teststrategi, såsom bottom-up-tilgangen (5). Et kemikalie, som ikke forudses at forårsage alvorlig øjenskade, eller som ikke er klassificeret som forårsagende irritation/alvorlig øjenskade med BCOP-forsøgsmetoden, vil kræve yderligere test (in vitro og/eller in vivo), for at den endelige klassificering kan fastslås.

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for øjenskade som målt ved dets evne til at inducere uklarhed og øget permeabilitet i en isoleret oksecornea. Toksiske virkninger for cornea måles ved: i) nedsat lystransmission (uklarhed) og ii) øget passage af farvestoffet natriumfluorescein (permeabilitet). Uklarheds- og permeabilitetsvurderingerne af cornea efter eksponering for et testkemikalie kombineres til udledning af en in vitro-irritationsscore (IVIS, In Vitro Irritancy Score), som anvendes til at klassificere testkemikaliets irritationsniveau.

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på ICCVAM BCOP-forsøgsmetodeprotokollen (6) (7), som oprindeligt blev udviklet på baggrund af oplysninger fra protokollen fra Institute for *in vitro* Sciences (IIVS) og INVITTOX Protocol 124 (8). Sidstnævnte er den protokol, der blev anvendt til De Europæiske Fællesskabers sponsorerede prævalideringsundersøgelse, som blev gennemført i 1997-1998. Begge disse protokoller var baseret på BCOP-forsøgsmetoden, som først blev rapporteret af Gautheron et al. (9).

BCOP-forsøgsmetoden kan anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade som defineret af UN GHS, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 (4). BCOP-forsøgsmetoden har til dette formål en generel nøjagtighed på 79 % (150/191), en falsk positiv-rate på 25 % (32/126) og en falsk negativ-rate på 14 % (9/65) sammenlignet med in vivo-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (3) (jf. tillæg 2, tabel 1). Når testkemikalier inden

▼M7

for visse kemiske (dvs. alkoholer, ketoner) eller fysiske (dvs. faste stoffer) klasser udelukkes fra databasen, har BCOP-forsøgsmetoden en nøjagtighed på 85 % (111/131), en falsk positiv-rate på 20 % (16/81) og en falsk negativ-rate på 8 % (4/50) for UN GHS-klassificeringssystemet (3). De mulige mangler ved BCOP-forsøgsmetoden, når den anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1) er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og ketoner og den høje falsk negativ-rate for faste stoffer i valideringsdatabasen (1) (2) (3). Da ikke alle alkoholer og ketoner imidlertid overfortolkes af BCOP-forsøgsmetoden, og nogle fortolkes korrekt som UN GHS-kategori 1, anses disse to organiske funktionelle grupper ikke for at ligge uden for forsøgsmetodens anvendelsesområde. Det er op til brugeren af denne forsøgsmetode at beslutte, om en mulig overfortolkning af en alkohol eller keton kan accepteres, eller om der bør foretages yderligere »weight-of-evidence«-undersøgelser. Med hensyn til falsk negativ-raterne for faste stoffer skal det bemærkes, at faste stoffer kan føre til varierende og ekstrem eksponering i in vivo-Draize-øjenirritationstesten, hvilket kan medføre irrelevante forudsigelser af deres sande irritationspotentiale (10). Det skal også bemærkes, at ingen af de falsk negative resultater i ICCVAM-valideringsdatabasen (2) (3) ved identifikation af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), resulterede i IVIS ≤ 3, som er det kriterium, der anvendes til at identificere et testkemikalie som UN GHS uden for kategori. Endvidere er falsk negative resultater af BCOP-forsøgsmetoden i denne forbindelse ikke afgørende, eftersom alle testkemikalier, der giver en 3 < INIS ≤ 55, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en »weight-of-the-evidence«-tilgang. Da visse faste kemikalier fortolkes korrekt af BCOP-forsøgsmetoden som UN GHS-kategori 1, anses denne fysiske tilstand heller ikke for at ligge uden for forsøgsmetodens anvendelsesområde. Undersøgeren kan overveje at anvende denne forsøgsmetode til alle typer kemikalier, hvorved en IVIS > 55 bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, der bør klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test. Som allerede nævnt bør positive resultater for alkoholer eller ketoner dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

BCOP-forsøgsmetoden kan også anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4). BCOP-forsøgsmetoden har til dette formål en generel nøjagtighed på 69 % (135/196), en falsk positiv-rate på 69 % (61/89) og en falsk negativ-rate på 0 % (0/107) i sammenligning med *in vivo*-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (3) (jf. tillæg 2, tabel 2). Den falsk negativ-rate, der opnås (in vivo-kemikalier klassificeret som UN GHS uden for kategori, der frembringer en IVIS > 3, jf. punkt 47) anses for at være høj, men ikke afgørende, eftersom alle testkemikalier, der giver en 3 < INIS ≤ 47, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en »weight-of-the-evidence«-tilgang. BCOP-forsøgsmetoden viser ingen specifikke mangler vedrørende test af alkoholer, ketoner og faste stoffer, når formålet er at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (UN GHS uden for kategori) (3). Undersøgerne kunne overveje at anvende denne forsøgsmetode til alle typer kemikalier, hvorved et negativt resultat (IVIS < 3) bør accepteres som tegn på, at ingen klassifikation er påkrævet (UN GHS uden for kategori). Da BCOP-forsøgsmetoden kun kan identificere 31 % af de kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, korrekt, må metoden ikke være det første valg til at indlede en bottom-up-tilgang (5), hvis der findes andre validerede og anerkendte in vitro- metoder med tilsvarende høj følsomhed, men højere specificitet.

▼M7

BCOP-valideringsdatabasen indeholdt i alt 113 stoffer og 100 blandinger (2) (3). BCOP-forsøgsmetoden anses derfor for at være gælde test af både stoffer og blandinger.

BCOP-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af testkemikalier, der bør klassificeres som øjenirriterende (UN GHS-kategori 2 eller -kategori 2A) eller testkemikalier, der bør klassificeres som let øjenirriterende (UN GHS-kategori 2B) som følge af det store antal kemikalier i UN GHS-kategori 1, der underklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B, og kemikalier, der ifølge UN GHS er uden for kategori, og som overklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B (2) (3). Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere test med en anden egnet metode.

Alle procedurer med okseøjne og oksecorneae bør følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (11).

Mens BCOP-forsøgsmetoden ikke tager højde for conjunctiva- og irisskader, behandler den corneavirkninger, som er de vigtigste faktorer for klassificering in vivo med hensyn til UN GHS-klassificering. Reversibiliteten af cornealæsioner kan ikke vurderes i sig selvmed BCOP-forsøgsmetoden. Det er på grundlag af kaninøjeundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at identificere visse typer irreversible virkninger (12). Der er dog behov for yderligere videnskabelig viden for at forstå, hvordan irreversible virkninger, der ikke er forbundet med indledende stor skade, opstår. Endelig muliggør BCOP-forsøgsmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

Denne forsøgsmetode vil blive opdateret regelmæssigt, i takt med at nye oplysninger og data behandles. Histopatologi kan f.eks. være potentielt nyttig ved behov for en mere fuldstændig beskrivelse af skader på cornea. Som beskrevet i OECD's vejledning nr. 160 (13) opfordres brugerne til at konservere corneae og udarbejde histopatologiprøver, der kan bruges til at udvikle en database og beslutningskriterier, der kan forbedre nøjagtigheden af denne forsøgsmetode yderligere.

Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af denne forsøgsmetode, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 3. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af BCOP-forsøgsmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af BCOP-forsøgsmetodedata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

BCOP-forsøgsmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder normal fysiologisk og biokemisk funktion af oksecornea in vitro. Ved denne forsøgsmetode vurderes testkemikaliets beskadigende virkning ved kvantitative målinger af ændringer i cornea-uklarhed og -permeabilitet med henholdsvis et opacitometer og et spektrofotometer til synligt lys. Begge målinger anvendes til at beregne en IVIS, som anvendes til at tildele en in vitro-irritationsfareklassificeringskategori med henblik på forudsigelse af et testkemikalies in vivo-øjenirritationspotentiale (jf. Beslutningskriterier i punkt 48).

I BCOP-forsøgsmetoden anvendes isolerede corneae fra øjnene fra friskslagtet kvæg. Cornea-uklarhed måles kvantitativt som mængden af lystransmission gennem cornea. Permeabilitet måles kvantitativt som mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der passerer gennem den fulde tykkelse af cornea som påvist i mediet i det bageste kammer. Testkemikalierne tilføres til cornea-epiteloverfladen ved tilsætning til corneaholderens forreste kammer. I tillæg 4 findes

▼M7

en beskrivelse af og et diagram over en corneaholder, som anvendes i BCOP-forsøgsmetoden. Corneaholdere kan købes i handelen fra forskellige kilder eller konstrueres.

Kilde til okseøjne og deres alder samt udvælgelse af dyrearter

Kvæg, som sendes til slagterier, aflives typisk enten med henblik på anvendelse til konsum eller anden kommerciel udnyttelse. Kun raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes som kilde til corneae til brug i BCOP-forsøgsmetoden. Eftersom vægtintervallet for kvæg er bredt og afhænger af race, alder og køn, er der ingen anbefalet vægt for dyrene på slagtetidspunktet.

Der kan forekomme variationer i corneadimensioner ved anvendelse af øjne fra dyr med forskellig alder. Corneae med en vandret diameter > 30,5 mm og værdier for den centrale corneatykkelse (CCT) på ≥ 1 100 μm stammer i almindelighed fra kvæg, som er mere end otte år gamle, mens corneae med en vandret diameter < 28,5 mm og CCT < 900 μm i almindelighed stammer fra kvæg, som er mindre end fem år gamle (14). Derfor anvendes der typisk ikke øjne fra kvæg, som er mere end 60 måneder gamle. Øjne fra kvæg, som er mindre end 12 måneder gamle, har traditionelt ikke været anvendt, eftersom disse øjne stadig er i udviklingsfasen, og corneatykkelsen og -diameteren er betydeligt mindre end det rapporterede for øjne fra voksent kvæg. Anvendelse af corneae fra yngre (dvs. 6-12 måneder gamle) dyr er imidlertid tilladelig, eftersom det giver visse fordele, såsom øget tilgængelighed, et snævert aldersinterval og nedsat risiko for potentiel arbejdstagereksponering for bovin spongiform encefalopati (BSE) (15). Da yderligere vurdering af betydningen af corneastørrelse eller -tykkelse for responsen på ætsende og irriterende kemikalier ville være nyttig, opfordres brugerne til at rapportere den estimerede alder og/eller vægt for de dyr, hvorfra de corneae, der undersøges, stammer.

Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

Øjnene indsamles af slagteriarbejdere. For at minimere mekanisk og anden beskadigelse af øjnene bør de enukleeres hurtigst muligt efter dyrenes aflivning og nedkøles straks efter enukleering og under transport. For at forhindre at øjnene eksponeres for potentielt irriterende kemikalier, må slagteriarbejderne ikke anvende rensemiddel, når de skyller dyrenes hoveder.

Øjnene bør nedsænkes helt i nedkølet Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en beholder af en passende størrelse og transporteres til laboratoriet på en sådan måde, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Eftersom øjnene indsamles under slagteprocessen, vil de kunne blive eksponeret for blod og andre biologiske materialer, herunder bakterier og andre mikroorganismer. Det er derfor vigtigt at sikre, at risikoen for kontaminering minimeres (f.eks. ved at opbevare beholderen med øjnene på våd is under indsamling og transport, ved at tilsætte antibiotika til den HBSS, som øjnene opbevares i under transport [f.eks. penicillin i en koncentration på 100 IE/ml og streptomycin i en koncentration på 100 μg/ml)].

Tidsintervallet mellem indsamling af øjnene og anvendelsen af corneae i BCOP-forsøgsmetoden bør minimeres (typisk indsamling og anvendelse samme dag), og det bør påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene såvel som de positive og negative kontrolresponser. Alle de øjne, som anvendes i assayet, bør stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i BCOP-forsøgsmetoden

Når øjnene er ankommet til laboratoriet, undersøges de omhyggeligt for defekter, herunder øget uklarhed, ridser og neovaskularisering. Der anvendes kun corneae fra øjne, som er fri for sådanne defekter.

▼M7

Kvaliteten af hver enkelt cornea vurderes også på senere assaytrin. Corneae med en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder eller tilsvarende for det opacitometer og de corneaholdere, der anvendes efter en indledende ligevægtsindstillingsperiode på en time, skal kasseres (*BEMÆRK*: opacitometeret bør kalibreres med uklarhedsstandarder, som anvendes til at fastlægge uklarhedsenhederne, se tillæg 4).

Hver behandlingsgruppe (testkemikalie, samtidige negative og positive kontroller) består af minimum tre øjne. Der bør anvendes tre corneae som negative kontrolcorneae i BCOP-forsøgsmetoden. Eftersom alle corneae udskæres fra det hele øjeæble og anbringes i corneakamrene, er der risiko for håndteringsforårsagede artefakter i de individuelle værdier for cornea-uklarhed og -permeabilitet (inklusive negativ kontrol). Uklarheds- og permeabilitetsværdierne for de corneae, der fungerer som negativ kontrol, anvendes desuden til at korrigere uklarheds- og -permeabilitetsværdierne for testkemikaliebehandlede og positiv kontrol-behandlede corneae i IVIS-beregningerne.

FREMGANGSMÅDE

Præparering af øjnene

Corneae, som er fri for defekter, fridissekeres således, at der stadig er en 2-3 mm sclerakant tilbage til hjælp ved efterfølgende håndtering, idet det tilstræbes at undgå at beskadige cornea-epitelet og -endotelet. Isolerede corneae anbringes i specialdesignede corneaholdere, der består af et forreste og bageste kammer, som grænser op til henholdsvis epitel- og endotelsiden af cornea. Begge kamre fyldes rigeligt op med forvarmet Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) fri for phenolrødt (bageste kammer først), idet det sikres, at der ikke dannes bobler. Derpå bringes anordningen i ligevægt ved 32 ± 1 °C i mindst en time for at gøre det muligt for corneae at komme i ligevægt med mediet og opnå normal metabolisk aktivitet i det omfang, det er muligt (den tilnærmelsesvise temperatur af cornea-overfladen in vivo er 32 °C).

Efter ligevægtsindstillingsperioden tilsættes frisk forvarmet EMEM fri for phenolrødt til begge kamre, og der aflæses basislinje-uklarhed for hver cornea. Alle corneae, som viser makroskopisk vævsbeskadigelse (f.eks. ridser, pigmentering, neovaskularisering) eller en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder eller tilsvarende for det opacitometer og de corneaholdere, der anvendes, kasseres. Mindst tre corneae udvælges som negative kontrolcorneae (eller opløsningsmiddelkontrolcorneae). De resterende corneae fordeles derpå i en behandlingsgruppe og en positiv kontrolgruppe.

Eftersom varmekapaciteten for vand er højere end for luft, giver vand mere stabile temperaturbetingelser til inkubering. Derfor anbefales det at benytte et vandbad til at holde corneaholderen og dens indhold ved 32 ± 1 °C. Der kan dog også anvendes luftinkubatorer under forudsætning af omhyggelig opretholdelse af en stabil temperatur (f.eks. ved forvarmning af holdere og medier).

Påføring af testkemikaliet

Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller — en for væsker og overfladeaktive stoffer (faste stoffer eller væsker) og en for ikke-overfladeaktive stoffer.

Væsker testes ufortyndede. Halvfaste stoffer, cremer og vokser testes typisk som væsker. Rene overfladeaktive stoffer testes ved en koncentration på 10 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt. Der bør gives passende begrundelse for alternative fortyndingskoncentrationer. Blandinger, der

▼M7

indeholder overfladeaktive stoffer, kan testes ufortyndet eller fortyndet til en passende koncentration, afhængigt af de relevante eksponeringsscenarier in vivo. Der bør gives passende begrundelse for den testede koncentration. Corneae eksponeres for væsker og overfladeaktive stoffer i 10 minutter. Anvendelse af andre eksponeringstider bør ledsages af en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse. Der henvises til tillæg 1 for en definition af overfladeaktive stoffer og blandinger indeholdende overfladeaktivt stof.

Ikke-overfladeaktive faste stoffer testes typisk som opløsninger eller opslæmninger ved en koncentration på 20 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt. Under visse omstændigheder og med behørig videnskabelig begrundelse kan faste stoffer også testes i ren form ved direkte påføring på corneaoverfladen ved anvendelse af metoden med åbent kammer (jf. punkt 32). Corneae eksponeres for faste stoffer i fire timer, men som for væsker og overfladeaktive stoffer kan der anvendes alternative eksponeringstider med en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse.

Der kan anvendes forskellige behandlingsmetoder alt efter testkemikaliets fysiske natur og kemiske egenskaber (f.eks. faste stoffer, væsker, viskøse kontra ikke-viskøse væsker). I den forbindelse er det absolut påkrævet at sikre, at testkemikaliet dækker epiteloverfladen tilstrækkeligt, og at det fjernes tilstrækkeligt under skylletrinnene. Der anvendes typisk en metode med lukket kammer for ikke-viskøse til let viskøse flydende testkemikalier, mens der typisk anvendes en metode med åbent kammer for halvviskøse og viskøse flydende testkemikalier og for rene faste stoffer.

Ved metoden med lukket kammer indføres der tilstrækkeligt testkemikalie (750 µl) til at dække cornea-epitelsiden i det forreste kammer gennem doseringshullerne på kammerets overside, og hullerne lukkes efterfølgende med kammerpropperne under eksponeringen. Det er vigtigt at sikre, at hver cornea eksponeres for et testkemikalie i det rette tidsinterval.

Ved metoden med åbent kammer fjernes vindueslåseringen og glasvinduet fra det forreste kammer inden behandling. Kontrol- eller testkemikaliet (750 µl — nok testkemikalie til at dække cornea helt) påføres direkte på cornea-epiteloverfladen ved anvendelse af en mikropipette. Hvis et testkemikalie er vanskeligt at pipettere, kan testkemikaliet fyldes i en pipette med positiv fortrængning under tryk for at lette doseringen. Spidsen på pipetten med positiv fortrængning indsættes i sprøjtens doseringsspids, således at materialet kan fyldes over i fortrængningsspidsen under tryk. Samtidig trykkes sprøjtestemplet ned, efterhånden som pipettestemplet trækkes opad. Hvis der dukker luftbobler op i pipettespidsen, fjernes testkemikaliet (det presses ud), og processen gentages, indtil spidsen er fyldt uden luftbobler. Om nødvendigt kan der anvendes en normal sprøjte (uden kanyle), eftersom en sådan sprøjte dels muliggør afmåling af et nøjagtigt volumen testkemikalie og dels letter påføring på cornea-epiteloverfladen. Efter doseringen sættes glasvinduet på plads på det forreste kammer for at genskabe et lukket system.

Inkubering efter eksponering

Efter eksponeringsperioden fjernes testkemikaliet, den negative kontrol eller det positive kontrolkemikalie fra det forreste kammer, og epitelet vaskes mindst tre gange (eller indtil der ikke længere er synlige tegn på testkemikalie) med EMEM (som indeholder phenolrødt). Der anvendes phenolrødt-holdigt medium til skylning, eftersom et farveskift for phenolrødt kan anvendes som indikator for effektiviteten af bortskylning af sure eller basiske testkemikalier. Corneae vaskes mere end tre gange, hvis phenolrødt stadig er misfarvet (gul eller violet), eller hvis testkemikaliet stadig er synligt. Når testkemikaliet er fjernet fra mediet, foretages en afsluttende skylning af corneae med EMEM (uden phenolrødt). EMEM (uden

▼M7

phenolrødt) anvendes til afsluttende skylning for at sikre fjernelse af phenolrødt fra det forreste kammer inden uklarhedsmålingen. Derefter fyldes det forreste kammer igen med frisk EMEM uden phenolrødt.

For væsker eller overfladeaktive stoffer inkuberes corneae efter skylning i yderligere to timer ved 32 ± 1 °C. Længere tid efter eksponering kan være nyttig under visse omstændigheder og kan overvejes i hvert enkelt tilfælde. Corneae, som er behandlet med faste stoffer, skylles grundigt ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode, men kræver ikke yderligere inkubering.

Ved afslutningen af inkubationsperioden efter eksponeringen for væsker og overfladeaktive stoffer og ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode for ikke-overfladeaktive faste stoffer registreres uklarheden og permeabiliteten for hver cornea. Desuden observeres hver cornea visuelt, og væsentlige observationer registreres (f.eks. vævsafskalning, resterende testkemikalie, uensartede uklarhedsmønstre). Disse observationer kan være vigtige, da de kan give sig udslag i variationer i opacitometeraflæsningerne.

Kontrolkemikalier

Der indgår samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/bærestofkontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

Ved test af et flydende stof i en koncentration på 100 % medtages der ved BCOP-forsøgsmetoden en samtidig negativ kontrol (f.eks. 0,9 % natriumchloridopløsning eller destilleret vand), således at der kan påvises ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Det sikrer også, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

Ved test af fortyndet væske, overfladeaktivt stof eller fast stof medtages der i BCOP-forsøgsmetoden en samtidig opløsningsmiddel/bærestof-kontrolgruppe, således at der kan påvises ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Kun et opløsningsmiddel/bærestof, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt, kan anvendes.

Et kemikalie, som vides at fremkalde en positiv respons, indgår som en sideløbende positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere integriteten af testsystemet og dets korrekte udførelse. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør irritationsresponsen imidlertid ikke være overdrevent stor.

Eksempler på positive kontroller for flydende testkemikalier er 100 % ethanol eller 100 % dimethylformamid. Et eksempel på en positiv kontrol for faste testkemikalier er 20 % vægt/volumen imidazol i 0,9 % natriumchloridopløsning.

Referencekemikalier er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialet for ukendte kemikalier i en særlig kemikalie- eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentiale for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponser.

Målte endepunkter

Uklarhed bestemmes ud fra mængden af lystransmission gennem cornea. Cornea-uklarhed måles kvantitativt ved hjælp af et opacitometer, hvorved der opnås uklarhedsværdier målt på en kontinuert skala.

Permeabilitet bestemmes ud fra mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag (dvs. fra epitelet på den udvendige cornea-overflade til endotelet på den indvendige cornea-overflade). Der tilsættes 1 ml natriumfluoresceinopløsning (henholdsvis 4 mg/ml ved test af væsker og overfladeaktive stoffer og 5 mg/ml ved test af ikke-overfladeaktive faste stoffer) til det forreste kammer i corneaholderen, som grænser op til epitelsiden af cornea, mens det bageste kammer, som grænser op til endotelsiden af cornea, fyldes med frisk EMEM. Derpå inkuberes holderen i vandret position i 90 ± 5 min. ved 32 ± 1 °C. Mængden af natriumfluorescein, der kommer ind i det bageste kammer,

▼M7

måles kvantitativt ved hjælp af UV/VIS-spektrofotometri. Spektrofotometriske målinger vurderet ved 490 nm registreres som OD490 (OD = optisk tæthed) eller absorbansværdier, som måles på en kontinuert skala. Fluoresceinpermeabilitetsværdierne bestemmes ved anvendelse af OD490-værdier, som er opnået med et spektrofotometer til synligt lys ved brug af en standardvejlængde på 1 cm.

Der kan alternativt anvendes en aflæser til en mikrotiterplade med 96 brønde, forudsat at i) pladeaflæserens lineære interval for bestemmelse af fluorescein-OD490-værdier kan fastlægges; og at ii) volumenet af fluoresceinprøverne i pladen med 96 brønde er korrekt, således at der opnås OD490-værdier svarende til standardvejlængden på 1 cm (dette kan kræve en helt fuld brønd [sædvanligvis 360 µl l)].

DATA OG RAPPORTERING

Datavurdering

Efter at uklarhedsværdier og gennemsnitlige permeabilitetsværdier (OD490-værdier) er korrigeret for baggrundsuklarhed og permeabilitets-OD490-værdierne for den negative kontrol, bør den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitets-OD490-værdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en empirisk udledt formel for at beregne en in vitro-irritationsscore (IVIS) for hver behandlingsgruppe som følger:

IVIS = gennemsnitlig uklarhedsværdi + (15 × gennemsnitlig permeabilitets-OD490-værdi)

Sina et al. (16) rapporterede, at denne formel blev udledt under interne og sammenlignende laboratorieundersøgelser. Data genereret for i alt 36 forbindelser i en undersøgelse med deltagelse af flere laboratorier blev underkastet flerdimensional analyse for at bestemme ligningen for bedste fit mellem in vivo- og in vitro-data. Denne analyse blev udført af forskere i to forskellige virksomheder, som udledte næsten identiske ligninger.

Uklarheds- og permeabilitetsværdierne bør også vurderes uafhængigt for at fastslå, om et testkemikalie kun inducerer ætsning eller stærk irritation ud fra et af de to endepunkter (jf. Beslutningskriterier).

Beslutningskriterier

IVIS-cut-off-værdier for identificering af testkemikalier, som medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), og testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (UN GHS uden for kategori) er angivet nedenfor:

IVIS	UN GHS
≤ 3	Uden for kategori
> 3; ≤ 55	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
> 55	Kategori 1

Undersøgelsesacceptkriterier

En test betragtes som acceptabel, hvis den positive kontrol giver en IVIS, der ligger inden for to standardafvigelser fra det aktuelle historiske gennemsnit, som skal ajourføres mindst hver tredje måned eller hver gang, der gennemføres en acceptabel test på laboratorier, hvor der sjældent gennemføres test (dvs. sjældnere end en gang om måneden). Negative eller opløsningsmiddel/bærestof-kontrolresponser bør resultere i uklarheds- og permeabilitetsværdier, der er mindre end de fastsatte øvre grænser for baggrundsuklarheds- og -permeabilitetsværdier for oksecorneae behandlet med den respektive negative kontrol eller opløsningsmiddel/bærestof-kontrol. En analyseserie bestående af mindst tre corneae bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringsresultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater i den første test bør det imidlertid overvejes at

▼M7

gennemføre endnu en analyseserie (men dette er ikke nødvendigvis påkrævet), samt en tredje i tilfælde af diskordante gennemsnitlige IVIS-resultater af de første to test. I denne forbindelse betragtes et resultat i den første test som tvetydigt, hvis forudsigelserne fra de tre corneae var diskordante, således at:

— to af de tre corneae gav diskordante forudsigelser i forhold til gennemsnittet af alle tre corneae, eller

— en af de tre corneae gav en diskordant forudsigelse i forhold til gennemsnittet af alle tre corneae, og det diskordante resultat var > 10 IVIS-enheder fra tærsklen på 55.

— Hvis den gentagne test støtter forudsigelsen fra den indledende test (baseret på den gennemsnitlige IVIS-værdi), kan der træffes en endelig beslutning uden yderligere test. Hvis resultatet af den gentagne test er en diskordant forudsigelse i forhold til den indledende test (baseret på den gennemsnitlige IVIS-værdi), bør der gennemføres en tredje og sidste test for at nå frem til en entydig forudsigelse og klassificere testkemikaliet. Det kan være tilladt at give afkald på yderligere test med henblik på klassificering og mærkning, hvis en test giver en forudsigelse om UN GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten bør omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

Test- og kontrolkemikalier

— Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes; CAS-registreringsnummer (RN), hvis dette kendes

— Renhed og sammensætning af test-/kontrolkemikalier (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige

— fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemikaliegruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse

— eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— stabilitet, hvis den kendes.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen.

Betingelser for forsøgsmetoden

— anvendt opacitometer (f.eks. model og specifikationer) og indstillinger

— kalibreringsoplysninger for udstyr anvendt til måling af uklarhed og permeabilitet (f.eks. opacitometer og spektrofotometer) for at sikre lineære målinger

— anvendt type corneaholdere (f.eks. model og specifikationer)

▼M7

— beskrivelse af andet anvendt udstyr

— den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af forsøgsmetoden over tid (f.eks. periodisk test af kompetencekemikalier).

Kriterier for en acceptabel test

— acceptable samtidige positive og negative kontrolintervaller på grundlag af historiske data

— acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

Indsamling og præparering af øjne

— identifikation af kilden til øjnene (dvs. den facilitet, hvor de er indsamlet)

— corneadiameter som mål for kildedyrets alder og egnethed til assayet

— opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for indsamling af øjnene, tidsinterval inden påbegyndelse af test, transportmedier og temperaturbetingelser, eventuelle anvendte antibiotika)

— præparering og montering af oksecorneae, herunder specifikation af deres kvalitet, temperatur af corneaholdere og kriterierne for udvælgelse af de corneae, der anvendes til test.

Testprocedure

— antal benyttede replikater

— identiteten af de anvendte positive og negative kontroller (hvor dette er relevant også opløsningsmiddel- og benchmarkkontroller)

— testkemikaliets koncentration(er), anvendelse, eksponeringstid og inkubationstid efter eksponering

— beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— beskrivelse af de anvendte beslutningskriterier.

Resultater

— angivelse i tabelform af data fra hver enkelt testprøve (f.eks. uklarheds- og OD490-værdier og beregnet IVIS for testkemikaliet og de positive kontroller, negative kontroller og referencekontrollerne [hvis de er medtaget] rapporteret i tabelform, herunder data fra flergangsbestemmelser/gentagne bestemmelser, hvis det er relevant, og gennemsnit ± standardafvigelsen for hvert forsøg)

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den afledte in vitro-klassificering ifølge UN GHS, hvor det er relevant.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

▼M7

LITTERATUR

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

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

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

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

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

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

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

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: Europæisk Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM).

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

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

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

▼**M7**

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

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

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

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

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

(17) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.

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

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

Tilgængelig på: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Benchmarkkemikalie: Et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et benchmarkkemikalie skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder, ii), strukturel og funktionel lighed med den klasse af kemikalier, der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde

Bottom-up-tilgang: Trinvis tilgang til et kemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Cornea: Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

Cornea-uklarhed: Måling af graden af cornea-uigennemsigtighed efter eksponering for et testkemikalie. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea. Uklarhed kan vurderes subjektivt som i Draize-kaninøjentesten eller objektivt med et instrument, såsom et »opacitometer«.

Corneapermeabilitet: Kvantitativ måling af beskadigelsen af cornea-epitelet ud fra bestemmelse af mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag.

Øjenirritation: Frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversible inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Reversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 2« (4).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

In vitro-irritationsscore (IVIS): En empirisk udledt formel, som anvendes i BCOP-forsøgsmetoden, og hvorved den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitetsværdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en enkelt in vitro-score for hver behandlingsgruppe. IVIS = gennemsnitlig uklarhedsværdi + (15 x gennemsnitlig permeabilitetsværdi).

Irreversible virkninger på øjet: Se »Alvorlig øjenskade«.

▼M7

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (4).

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Ikke klassificeret: Kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation (UN GHS-kategori 1) eller alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 2). Udskiftelige med »UN GHS uden for kategori«.

Opacitometer: Et instrument, som anvendes til at måle »cornea-uklarhed« ved kvantitativ vurdering af **lystransmission gennem cornea.** Det typiske instrument har to kamre, som hver har sin egen lyskilde og fotocelle. Det ene kammer anvendes til den behandlede cornea, mens det andet anvendes til at kalibrere og nulstille instrumentet. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolkammer (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgskammeret, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Reversible virkninger på øjet: Se »Øjenirritation«.

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelig med »Irreversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 1« (4).

Opløsningsmiddel/bærestof-kontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (4).

▼M7

Overfladeaktivt stof (surfactant): Også kaldet overfladeaktivt stof. Et stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer. Kaldes også for befugtningsmiddel.

Blanding indeholdende overfladeaktivt stof: I forbindelse med denne forsøgsmetode en blanding, der indeholder et eller flere overfladeaktive stoffer i en endelig koncentration på > 5 %.

Top-down-tilgang: Trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvise teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (4).

UN GHS-kategori 1: Se »Alvorlig øjenskade«.

UN GHS-kategori 2: Se »Øjenirritation«.

UN GHS uden for kategori: Kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Udskiftelig med »Ikke-klassificeret«.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

»Weight-of-the-evidence«: En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et testkemikalies farepotentiale.

▼M7

Tillæg 2

BCOP-FORSØGSMETODENS FORUDSIGELSESEVNE

Tabel 1

BCOP's forudsigelsesevne til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade [UN GHS/EU CLP-kat 1 mod ikke kat 1 (kat 2 + uden for kat); US EPA-kat I mod ikke kat I (kat II + kat III + kat IV)]

Klassificeringssystem	Antal	Nøjagtighed		Følsomhed		Falsk negativ		Specificitet		Falsk positiv	
		%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal
UN GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabel 2

BCOP's forudsigelsesevne til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (»ikke-øjenirriterende«) [UN GHS/ EU CLP uden for kat mod ikke uden for kat (kat 1 + kat 2); US EPA kat IV mod ikke kat IV (kat I + kat II + kat III)]

Klassificeringssystem	Antal	Nøjagtighed		Følsomhed		Falsk negativ		Specificitet		Falsk positiv	
		%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal
UN GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Tillæg 3

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL BCOP-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenrisikoklassificeringen for de 13 anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for øjenrisiko, der er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405) (17) og UN GHS-klassificeringssystemet (dvs. UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (4). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes in vitro-data af høj kvalitet for BCOP-forsøgsmetoden. Referencedata findes i SSD (Streamlined Summary Document) (3) og i ICCVAM Background Review Document for BCOP-forsøgsmetoden (2) (18).

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af BCOP-forsøgsmetoden

Kemikalie	CAS-registreringsnummer	Kemikaliegruppe (1)	Fysisk form	In vivo-klassificering (2)	BCOP-klassificering
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Trichloreddikesyre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dichlorbenzoylchlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
Ethyl-2-methylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2 (3)	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
EDTA, dikaliumsalt	25102-12-9	Amin, carboxylsyre (salt)	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyether	Flydende	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
2-mercaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalogenid	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
Phenylbutazon	50-33-9	Heterocyklisk	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret

▼**M7**

Kemikalie	CAS-registre-ringsnummer	Kemikaliegruppe (1)	Fysisk form	In vivo-klassificering (2)	BCOP-klassificering
Polyoxyethylen-23-laurylether (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Flydende	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) (17) og brug af UN GHS (4).

(3) Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for at skelne mellem disse to kategorier, dvs. et ud af tre mod to ud af tre dyr med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at skabe en kategori 2A-klassifikation. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle endepunkter bortset fra conjunctiva-rødme hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Den ene dyr, som ikke var i fuld bedring på dag 7, havde en score for conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7) med fuld bedring på dag 10.

▼M7

Tillæg 4

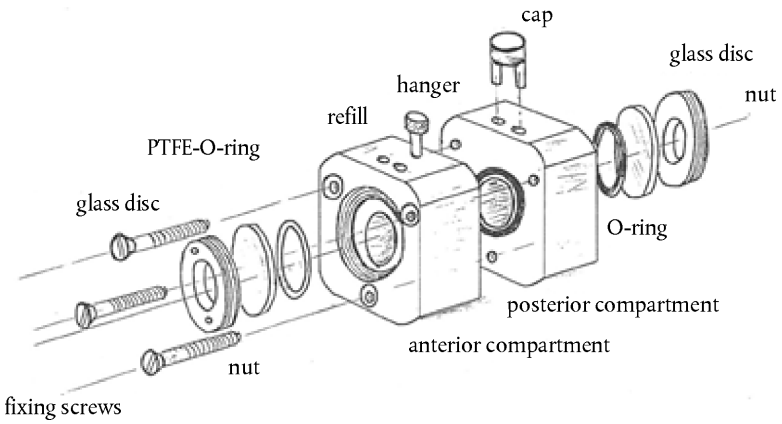
BCOP-CORNEAHOLDEREN

BCOP-corneaholderne er fremstillet af et inaktivt materiale (f.eks. polypropylen). Holderne består af to halvdele (et forreste og et bageste kammer) og har to ens cylindriske indre kamre. Hvert kammer kan rumme et volumen på ca. 5 ml og er afgrænset af et glasvindue, gennem hvilket der foretages uklarhedsmålinger. Hvert indre kammer har en diameter på 1,7 cm og en dybde på 2,2 cm ([1]). Der er anbragt en o-ring på det bageste kammer for at forhindre lækager. Corneae anbringes med endotelsiden nedad på de bageste kamres o-ring, og de forreste kamre anbringes på epitelsiden af corneae. Kamrene holdes på plads med tre skruer af rustfrit stål, som er placeret på de udvendige kammerkanter. Der er placeret et glasvindue for enden af hvert kammer, som kan fjernes, så der er let adgang til cornea. Der er også anbragt en o-ring mellem glasvinduet og kammeret for at forhindre lækager. To huller på hvert kammers overside muliggør tilførsel og fjernelse af medium og testkemikalier. De er lukket med gummihætter under behandling og inkubering. Lystransmissionen gennem corneaholdere kan ændres, da virkningerne af slitage eller ophobning af specifikke kemikalierester på det indre kammers huller eller på glasvinduerne kan påvirke lysspredning eller reflektans. Som følge heraf kan der forekomme stigninger eller fald i basislinjelystransmission (og omvendt i basislinjeuklarhedsaflæsninger) gennem corneaholderne, og dette kan vise sig som markante ændringer i de forventede indledende basislinjemålinger af cornea-uklarhed i de enkelte kamre (dvs. de indledende værdier for cornea-uklarhed i specifikke corneaholdere kan rutinemæssigt afvige mere end to eller tre uklarhedsenheder fra de forventede basislinjeværdier). Hvert laboratorium bør overveje at oprette et program til evaluering af ændringer i lystransmission gennem corneaholdere, afhængigt af arten af de testede kemikalier og hvor hyppigt kamrene anvendes. For at fastlægge basislinjeværdier kan corneaholdere kontrolleres før rutinemæssig brug ved at måle baselinjeværdier for uklarhed (eller lystransmission) i kamre fyldt med komplet medium uden corneae. Corneaholderne kontrolleres derefter med jævne mellemrum for ændringer i lystransmissionen i de anvendte perioder. Hvert laboratorium kan fastsætte hyppigheden for kontrol af corneaholdere baseret på de testede kemikalier, hyppigheden af brug og observationer af ændringer i basislinjeværdierne for cornea-uklarhed. Hvis der observeres markante ændringer i lystransmissionen gennem corneaholderne, må det overvejes at gennemføre egnede rengørings- og/eller poleringsprocedurer for den indvendige overflade af corneaholderne eller foretage udskiftning.

([1]) De angivne dimensioner gælder for en corneaholder, som anvendes til køer i alderen fra 12 til 60 måneder. Hvis der anvendes dyr i alderen fra 6 til 12 måneder, vil holderen i stedet skulle konstrueres således, at hvert kammer kan rumme et volumen på 4 ml, og hvert af de indre kamre har en diameter på 1,5 cm og en dybde på 2,2 cm. For enhver nykonstrueret corneaholder er det meget væsentligt, at forholdet mellem det eksponerede corneaoverfladeareal og det bageste kammers volumen er det samme som forholdet i den traditionelle corneaholder. Det er nødvendigt for at sikre, at permeabilitetsværdierne bestemmes korrekt til beregning af IVIS ved hjælp af den foreslåede formel.

▼M7

Corneaholder: eksploderet diagram



▼**M7**

Tillæg 5

OPACITOMETERET

Opacitometeret er en anordning til måling af lystransmission. Ved det OP-KIT-udstyr fra Electro Design (Riom, Frankrig), der anvendes til validering af BCOP-forsøgsmetoden, sendes lys fra en halogenlampe gennem et kontrolkammer (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgskammeret, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display. Uklarhedsenhederne fastlægges. Andre typer opacitometer med en anden opsætning (der f.eks. ikke kræver parallelle målinger af kontrol- og forsøgskammer) kan anvendes, hvis de har vist sig at give samme resultater som det validerede udstyr.

Opacitometeret bør give en lineær respons for en række uklarhedsaflæsninger, som omfatter de til de forskellige klassificeringer anvendte tærskelværdier, som er beskrevet med den anvendte Prediction Model (dvs. op til den tærskelværdi, som er bestemmende for klassificering som ætsning/stærk irritation). For at sikre lineære og nøjagtige aflæsninger op til 75-80 uklarhedsenheder er det nødvendigt at kalibrere opacitometeret ved hjælp af en række kalibratorer. Kalibratorerne anbringes i kalibreringskammeret (et corneakammer, som er konstrueret til at rumme kalibratorerne), hvorefter opacitometeret aflæses. Kalibreringskammeret er konstrueret til at rumme kalibratorerne i ca. samme position mellem lyset og fotocellen, som corneae vil blive anbragt i under uklarhedsmålingerne. Referenceværdier og indledende opsætning afhænger af, hvilken type udstyr der anvendes. Lineariteten af uklarhedsmålingerne bør sikres ved passende (instrumentspecifikke) procedurer. Til OP-KIT-udstyret fra Electro Design (Riom, Frankrig) kalibreres opacitometeret f.eks. først til 0 uklarhedsenheder ved anvendelse af kalibreringskammeret uden kalibrator. Derpå anbringes tre forskellige kalibratorer en efter en i kalibreringskammeret, og uklarhederne måles. Kalibrator 1, 2 og 3 bør give uklarhedsaflæsninger svarende til deres forudfastsatte værdier på henholdsvis 75, 150 og 225 uklarhedsenheder ± 5 %.

▼M7

B.48. ISOLERET KYLLINGEØJE-FORSØGSMETODE TIL IDENTIFIKATION AF I) KEMIKALIER, DER FREMKALDER ALVORLIG ØJENSKADE OG II) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIG ØJENSKADE

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 438 (2013). Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden blev evalueret af Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) i 2006 og 2010 (1) (2) (3). I den første evaluering blev ICE godkendt som en videnskabeligt gyldig forsøgsmetode til brug som screeningtest til identifikation af kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (kategori 1) som defineret i FN's globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) (2) (4) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ([1]). I den anden evaluering blev ICE-forsøgsmetoden evalueret med henblik på brug som screeningtest til identifikation af kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation eller alvorlig øjenskade som defineret i UN GHS (3) (4). Resultaterne af valideringsundersøgelserne og peer review-panelets anbefalinger opretholdt den oprindelige anbefaling om at bruge ICE til klassificering af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), eftersom den tilgængelige database var uændret siden den oprindelige ICCVAM-validering. På det tidspunkt blev der ikke foreslået yderligere anbefalinger om at udvide ICE's anvendelsesområde (domæne) til også at omfatte andre kategorier. Der blev foretaget en revurdering af in vitro- og in vivo-datasættet, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen, med fokus på at vurdere, om ICE kunne anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (5). Konklusionen på revurderingen var, at ICE-forsøgsmetoden også kan anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlig øjenskade som defineret af UN GHS (4) (5). Forsøgsmetoden omfatter den anbefalede anvendelse og begrænsninger af ICE-forsøgsmetoden baseret på disse evalueringer. De vigtigste forskelle mellem den oprindelige version fra 2009 og den ajourførte version fra 2013 af OECD's vejledning omfatter, men er ikke begrænset til, brug af ICE-forsøgsmetoden til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet, en ajourføring af testrapportens elementer, en ajourføring af tillæg 1 om definitioner og en ajourføring af tillæg 2 om kompetencekemikalierne.

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-øjenirritationstest, der vil kunne erstatte in vivo-Draize-øjentesten til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis erstatte Draize-øjentesten (6). Top-down-tilgangen (7) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ventes at have et højt irritationspotentiale, mens bottom-up-tilgangen (7) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til at kræve en klassificering. ICE-forsøgsmetoden er en in vitro-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger som beskrevet i punkt 8 til 10 for klassificering af risikoen for øjenskader og mærkning af kemikalier. Selv om den ikke betragtes som gyldig som enkeltstående erstatning for in vivo-kaninøjentesten, anbefales ICE-forsøgsmetoden som første trin i en teststrategi såsom top-down-tilgangen som anført af Scott et al. (7) til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test (4). ICE-forsøgsmetoden anbefales også til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, som defineret i UN GHS (uden for kategori), og kan derfor anvendes som det indledende trin i en bottom-up-tilgang (7). Et kemikalie, der ikke forudses at forårsage alvorlig øjenskade eller som ikke

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M7

er klassificeret for øjenirritation/alvorlig øjenskade med ICE-forsøgsmetoden, vil kræve yderligere test (in vitro og/eller in vivo), for at den endelige klassificering kan fastslås. Desuden bør de relevante kompetente myndigheder høres, før ICE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS.

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskade som målt ved dets evne til at inducere toksicitet i et enukleeret kyllingeøje. Toksiske virkninger på cornea måles ved i) en kvalitativ vurdering af uklarhed, ii) en kvalitativ vurdering af epitelbeskadigelse på grundlag af påføring af fluorescein på øjet (fluoresceinretention), iii) en kvantitativ måling af øget tykkelse (opsvulmning) og iv) en kvalitativ vurdering af makroskopisk morfologisk overfladebeskadigelse. Vurderingerne af cornea-uklarhed, -opsvulmning og -beskadigelse efter eksponering for et testkemikalie evalueres individuelt, hvorefter de kombineres til udledning af en Eye Irritancy Classification (øjenirritationsklassificering).

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på den foreslåede protokol i OECD's vejledning 160 (8), som blev udviklet efter den internationale ICCVAM-valideringsundersøgelse (1) (3) (9) med bidrag fra Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods og TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederlandene). Protokollen er baseret på oplysninger fra offentliggjorte protokoller, såvel som TNO's aktuelt anvendte protokol (10) (11) (12) (13) (14).

Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og den empiriske database for valideringsundersøgelsen omfatter 152 kemikalier i alt, herunder 72 stoffer og 80 blandinger (5). Forsøgsmetoden anvendes på faste stoffer, væsker, emulsioner og geler. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse.

ICE-forsøgsmetoden kan anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 (4). De identificerede begrænsninger, der anvendes til denne ICE-forsøgsmetode, er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og de høje falsk negativ-rater for faste stoffer og overfladeaktive stoffer (1) (3) (9). Falske negativ-rater er imidlertid ikke afgørende i denne forbindelse (UN GHS-kategori 1 identificeret som ikke UN GHS-kategori 1), eftersom alle testkemikalier, der giver en $1 < \text{INIS} \leq 1$, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en »weight-of-the-evidence«-tilgang. Det bør bemærkes, at faste stoffer kan føre til varierende og ekstrem eksponering i in vivo-Draize-øjenirritationstesten, hvilket kan medføre irrelevante forudsigelser af deres sande irritationspotentiale (15). Undersøgeren kan overveje at anvende denne

▼M7

forsøgsmetode til alle typer af kemikalier, hvorved et positivt resultat bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, dvs. UN GHS-kategori 1 uden yderligere test. Positive resultater for alkoholer bør dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

Ved identificering af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), har ICE-forsøgsmetoden en generel nøjagtighed på 86 % (120/140), en falsk positiv-rate på 6 % (7/113) og en falsk negativ-rate på 48 % (13/27) i sammenligning med in vivo-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5).

ICE-forsøgsmetoden kan også anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4). De relevante kompetente myndigheder bør høres, før ICE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger. Denne forsøgsmetode kan anvendes til alle typer af kemikalier, hvor der kan accepteres et negativt resultat, som ikke klassificerer et kemikalie for øjenirritation og alvorlig øjenskade. På grundlag af et resultat af valideringsdatabasen kan der forekomme underfortolkning af antifoulingmaling, der indeholder organiske opløsningsmidler (5).

Ved identificering af kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlig øjenskade, har ICE-forsøgsmetoden en generel nøjagtighed på 82 % (125/152), en falsk positiv-rate på 33 % (26/79) og en falsk negativ-rate på 1 % (1/73) sammenlignet med in vivo-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5). Når testkemikalier i visse klasser (dvs. antifoulingmaling, der indeholder organiske opløsningsmidler) udelukkes fra databasen, er nøjagtigheden af ICE-forsøgsmetoden 83 % (123/149), falsk positiv-raten 33 % (26/78) og falsk negativ-raten 0 % (0/71) for UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5).

ICE-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af testkemikalier, der bør klassificeres som øjenirriterende (dvs. UN GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier, der bør klassificeres som let øjenirriterende (UN GHS-kategori 2B), som følge af det store antal kemikalier i UN GHS-kategori 1, som underklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B, og kemikalier, der ifølge UN GHS er uden for kategori, og som overklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B. Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere test med en anden egnet metode.

Alle procedurer med kyllingeøjne bør følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af humane eller animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (16).

Mens ICE-forsøgsmetoden ikke tager højde for conjunctiva- og irisskader som evalueret i kaninøjeforsøgsmetoden for irritation, behandler den corneavirkninger, som er den vigtigste faktor for klassificering in vivo i betragtning af UN GHS-klassificeringen. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med ICE-forsøgsmetoden, men det er på grundlag af kaninøjeundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at identificere visse typer irreversible virkninger (17). Der er navnlig behov for yderligere videnskabelig viden for at forstå, hvordan irreversible virkninger, der ikke er forbundet med indledende stor skade, opstår. Endelig

▼M7

muliggør ICE-forsøgsmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

Denne forsøgsmetode vil blive opdateret regelmæssigt, i takt med at nye oplysninger og data behandles. Histopatologi kan f.eks. være potentielt nyttig ved behov for en mere fuldstændig beskrivelse af skader på cornea. Ved evaluering af denne mulighed opfordres brugerne til at konservere øjnene og udarbejde histopatologiprøver, der kan bruges til at udvikle en database og beslutningskriterier, der kan forbedre nøjagtigheden af denne forsøgsmetode yderligere. OECD har udarbejdet en vejledning i brug af in vitro- øjentoksicitetsforsøgsmetoder, som omfatter detaljerede procedurer for indsamling af histopatologiprøver og oplysninger om, hvor man kan indsende prøver og/eller histopatologiske data (8).

Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af ICE-forsøgsmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af ICE-data med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

ICE-forsøgsmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder kyllingeøjets funktion in vitro. Ved denne forsøgsmetode vurderes testkemikaliets beskadigende virkning ved bestemmelse af corneaopsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention. Mens de to sidstnævnte parametre indebærer en kvalitativ vurdering, medfører analyse af corneaopsvulmning, at der skal foretages en kvantitativ vurdering. Hver måling konverteres enten til en kvantitativ score, som anvendes til beregning af et samlet irritationsindeks (Irritation Index), eller tildeles en kvalitativ kategorisering, som anvendes til at tildele en in vitro-fareklassificering enten som UN GHS-kategori 1 eller som UN GHS uden for kategori. Disse resultater kan derefter anvendes til at forudsige potentiel alvorlig øjenskade in vivo eller fraværet af kravet om klassificering af risikoen for øjenskade for et testkemikalie (jf. Beslutningskriterier). Der kan imidlertid ikke gives nogen klassificering for kemikalier, som ikke forudsiges at medføre alvorlig øjenskade, eller som ikke er klassificeret med ICE-forsøgsmetoden (jf. punkt 11).

Kilde til kyllingeøjne og deres alder

Historisk set er der til dette assay anvendt øjne indsamlet fra kyllinger på et slagteri, hvor de aflives med henblik på anvendelse til konsum, hvilket eliminerer behovet for forsøgsdyr. Kun øjnene fra raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes.

Selv om der ikke er gennemført en kontrolleret undersøgelse til vurdering af den optimale kyllingealder, har de ved denne forsøgsmetode anvendte kyllinger historisk set haft samme alder og vægt som de på et fjerkræslagteri traditionelt behandlede vårkyllinger (dvs. ca. syv uger gamle kyllinger med en vægt på 1,5-2 kg).

Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

Hovederne bør fjernes umiddelbart efter sedering af kyllingerne, som sædvanligvis sker ved elektrisk stød, og incision i halsen med henblik på afblødning. Der bør findes en lokal kilde til kyllinger tæt på laboratoriet, således at deres hoveder kan overføres fra slagteriet til laboratoriet hurtigt nok til, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Tidsintervallet mellem indsamling af kyllingehovederne og placering af øjnene i superfusionsapparatets kammer efter enukleering bør minimeres (typisk inden for to timer) for at sikre, at assayets acceptkriterier overholdes. Alle de øjne, som anvendes i assayet, bør stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

▼M7

Eftersom øjnene fridissekeres i laboratoriet, transporteres de intakte hoveder fra slagteriet ved omgivende temperatur (typisk mellem 18 °C og 25 °C) i plastkasser befugtet med klude, som er vædet med isotonisk saltvand.

Udvælgelseskriterier for og antal øjne, der anvendes i ICE-testen

Øjne med et højt niveau af basislinjefluoresceinfarvning (dvs. > 0,5) eller en høj cornea-uklarhedsscore (dvs. > 0,5) efter enukleering kasseres.

Hver behandlingsgruppe og en samtidig positiv kontrol består af mindst tre øjne. Den negative kontrolgruppe eller opløsningsmiddelkontrollen (hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end saltvand) består af mindst et øje.

I tilfælde af faste materialer, der resulterer i UN GHS uden for kategori, anbefales det at foretage endnu en test af tre øjne for at be- eller afkræfte det negative resultat.

FREMGANGSMÅDE

Præparering af øjnene

Øjenlågene bortskæres forsigtigt og uden at beskadige cornea. Der foretages en hurtig vurdering af cornea-integriteten ved at påføre en dråbe 2 % (vægt/volumen) natriumfluorescein på cornea-overfladen i nogle få sekunder, hvorefter der skylles med isotonisk saltvand. De fluoresceinbehandlede øjne undersøges derefter med et spaltelampemikroskop for at sikre, at cornea er ubeskadiget (dvs. har scorer for fluoresceinretention og cornea-uklarhed ≤ 0,5).

Er cornea ubeskadiget, fridissekeres øjet helt fra kraniet uden at beskadige cornea. Øjeæblet trækkes ud af øjenhulen ved et fast tag i blinkhinden med en kirurgisk tang, og øjenmusklerne skæres over med en bøjet, stumpendet saks. Det er vigtigt at undgå skader på cornea som følge af overdrevent tryk (dvs. komprimeringsartefakter).

Når øjet fjernes fra øjenhulen, skal der medfølge en synlig vedhængende del af synsnerven. Efter fjernelsen fra øjenhulen anbringes øjet på et absorberende underlag, hvorefter blinkhinden og andet bindevæv skæres væk.

Det enukleerede øje anbringes i en rustfri stålholder med cornea i lodret position. Derefter indsættes holderen i et kammer i superfusionsapparatet (18). Holderne bør anbringes sådan i superfusionsapparatet, at det isotoniske saltvand drypper ned over hele cornea (3-4 dråber pr. minut eller 0,1 til 0,15 ml/min). Temperaturen i superfusionsapparatets kamre bør være reguleret til 32 ± 1,5 °C. Tillæg 3 indeholder et diagram over et typisk superfusionsapparat og øjenholderne, som kan købes i handelen eller konstrueres. Apparatet kan modificeres, så det opfylder det enkelte laboratoriums behov (f.eks. så det kan rumme et andet antal øjne).

Efter anbringelsen i superfusionsapparatet undersøges øjnene igen med et spaltelampemikroskop for at sikre, at de ikke er blevet beskadiget under dissektionsproceduren. På dette tidspunkt måles også corneatykkelsen. Den måles ved corneas toppunkt ved anvendelse af dybdemålingsanordningen på spaltelampemikroskopet. Øjne med i) en fluoresceinretentionsscore på > 0,5, ii) en cornea-uklarhed på > 0,5 eller iii) eventuelle andre tegn på beskadigelse bør udskiftes. Af de øjne, der ikke kasseres ud fra nogen af ovennævnte kriterier, kasseres øjne med en corneatykkelse, som afviger mere end 10 % fra gennemsnitsværdien for alle øjne. Brugerne skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden. Spaltebredden bør indstilles til 0,095 mm.

▼M7

Når alle øjnene er undersøgt og godkendt, inkuberes de i ca. 45 til 60 minutter for at bringe dem i ligevægt med testsystemet inden dosering. Efter ligevægtsindstillingsperioden foretages en nulpunktsreferencemåling af corneatykkelse og -uklarhed, der skal fungere som basislinje (dvs. tid = 0). Den ved fridissekering bestemte fluoresceinscore anvendes som basislinjemåling for det endepunkt.

Påføring af testkemikaliet

Umiddelbart efter nulpunktsreferencemålingerne fjernes øjet (i sin holder) fra superfusionsapparatet og anbringes i vandret position, hvorefter testkemikaliet påføres på cornea.

Flydende testkemikalier testes typisk ufortyndede, men kan fortyndes, hvis det anses for nødvendigt (f.eks. som del af undersøgelsens design). Det foretrukne opløsningsmiddel til fortyndede testkemikalier er fysiologisk saltvand. Der kan imidlertid også anvendes alternative opløsningsmidler under kontrollerede betingelser, men egnetheden af andre opløsningsmidler end fysiologisk saltvand bør påvises.

Flydende testkemikalier påføres på cornea således, at hele overfladen af cornea dækkes jævnt med testkemikaliet. Standardvolumenet er 0,03 ml.

Om muligt bør faste testkemikalier formales så fint som muligt med morter og støder eller et tilsvarende formalingsværktøj. Pulveret påføres på cornea således, at overfladen dækkes jævnt med testkemikaliet. Standardmængden er 0,03 g.

Når testkemikaliet (flydende eller fast) har været påført i 10 sekunder, skylles det væk fra øjet med isotonisk saltvand (ca. 20 ml) ved omgivende temperatur. Øjet (i sin holder) sættes derefter tilbage i superfusionsapparatet i sin oprindelige opretstående position. Hvis der er behov for yderligere skylning, kan dette ske 10 sekunder efter påførelsen og på efterfølgende tidspunkter (f.eks. ved fund af rester af testkemikaliet på cornea). Generelt er det ikke afgørende, hvilken mængde saltvand der bruges til yderligere skylning, men det er vigtigt at observere, om kemikaliet klæber fast til cornea.

Kontrolkemikalier

Der bør indgå samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/bærestofkontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

Ved test af væsker i en koncentration på 100 % eller faste stoffer anvendes fysiologisk saltvand som den samtidige negative kontrol ved ICE-forsøgsmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

Ved test af fortyndede væsker medtages en samtidig opløsningsmiddel/bærestofkontrolgruppe ved forsøgsmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons. Som anført i punkt 31 kan der kun anvendes et opløsningsmiddel/bærestof, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt.

Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom ICE-assayet anvendes i denne forsøgsmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, bør den positive kontrol være et referencekemikalie, som inducerer en svær respons ved denne forsøgsmetode. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den svære respons imidlertid ikke være overdrevent stor. Der bør genereres tilstrækkelige in vitro-data for den positive kontrol, således at der kan beregnes et statistisk defineret acceptabelt interval for den positive kontrol. Hvis der ikke

▼M7

er tilstrækkelige historiske ICE-forsøgsmetodedata tilgængelige for en bestemt positiv kontrol, kan det være nødvendigt at gennemføre undersøgelser for at tilvejebringe disse oplysninger.

Eksempler på positive kontroller for flydende testkemikalier er 10 % eddikesyre eller 5 % benzalkoniumchlorid, mens eksempler på positive kontroller for faste testkemikalier er natriumhydroxid eller imidazol.

Referencekemikalier er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialet for ukendte kemikalier i en særlig kemikalie- eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentiale for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponser.

Målte endepunkter

Behandlede corneae vurderes inden behandlingen og ved 30, 75, 120, 180 og 240 minutter (± 5 minutter) efter skylningen efter behandlingen. Med disse tidspunkter opnås et passende antal målinger over behandlingsperioden på fire timer, samtidig med at der er tilstrækkelig tid mellem målingerne til at foretage de fornødne observationer for alle øjnene.

De vurderede endepunkter er cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention samt morfologiske virkninger på cornea (f.eks. erosion eller løsning af epitelet). Alle endepunkterne med undtagelse af fluoresceinretention (som kun bestemmes inden behandlingen og 30 minutter efter eksponering med testkemikaliet) bestemmes på hvert af de ovennævnte tidspunkter.

Det tilrådes at tage fotografier for at dokumentere cornea-uklarhed og -fluoresceinretention, morfologiske virkninger på cornea og, hvis det udføres, histopatologi.

Efter den afsluttende undersøgelse efter fire timer opfordres brugerne til at konservere øjnene i et egnet fikseringsmiddel (f.eks. neutralbufret formalin) med henblik på eventuel histopatologisk undersøgelse (jf. punkt 14 og henvisning (8) for nærmere oplysninger).

Cornea-opsvulmning bestemmes ud fra corneatykkelsesmålinger foretaget med et optisk pachymeter på et spaltelampemikroskop. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved hjælp af følgende formel:

$$\left(\frac{\textit{corneatykkelse ved tidspunkt } t - \textit{corneatykkelse ved tidspunkt} = 0}{\textit{corneatykkelse ved tidspunkt} = 0} \right) \times 100$$

Den gennemsnitlige procentvise cornea-opsvulmning for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-opsvulmning som observeret på et hvilket som helst af tidspunkterne opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

Vurderingen af cornea-uklarhed baseres på scoring af det område af cornea, hvor uklarheden er mest udtalt som vist i tabel 1. Den gennemsnitlige værdi for cornea-uklarhed for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-uklarhed som observeret på et hvilket som helst af tidspunkterne opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

▼M7

Tabel 1

Score for cornea-uklarhed

Score	Observation
0	Ingen uklarhed
0,5	Meget ubetydelig uklarhed
1	Spredte eller diffuse områder; detaljer i iris ses tydeligt
2	Let skelneligt gennemskinneligt område; detaljer i iris er en anelse utydelige
3	Stærk cornea-uklarhed; ingen specifikke detaljer i iris er synlige; pupillens størrelse kan kun lige akkurat skelnes
4	Fuldstændig cornea-uklarhed; iris usynlig

Fluoresceinretention vurderes kun ved 30-minutters observationstidspunktet som vist i tabel 2. Den gennemsnitlige fluoresceinretentionsværdi for alle testøjnene beregnes herefter for 30-minutters observationstidspunktet og bruges til at opnå den samlede kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

Tabel 2

Score for fluoresceinretention

Score	Observation
0	Ingen fluoresceinretention
0,5	Meget ubetydelig enkeltcellefarvning
1	Enkeltcellefarvning spredt ud over hele det behandlede område af cornea
2	Fokal eller sammenflydende enkeltcellefarvning med høj tæthed
3	Fluorescein er tilbageholdt i store sammenflydende områder af cornea

Morfologiske virkninger omfatter »erosion« af cornea-epitelceller, »løsning« af epitelet, »tiltagende ruhed« af cornea-overfladen og »fastklæben« af testkemikaliet til cornea. Disse resultater kan have varierende sværhedsgrad og kan forekomme samtidig. Klassificeringen af disse resultater er subjektiv og baseret på undersøgerens fortolkning.

DATA OG RAPPORTERING

Datavurdering

Resultaterne for cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention bør vurderes særskilt for at finde frem til en ICE-stofgruppe for hvert endepunkt. Derefter kombineres ICE-stofgrupperne for hvert endepunkt for at opnå en irritationsklassificering (Irritancy Classification) for hvert testkemikalie.

Beslutningskriterier

Når hvert af endepunkterne er vurderet, kan der fastlægges ICE-stofgrupper på grundlag af forudfastsatte intervaller. Fortolkning af cornea-opsvulmning (tabel 3), -uklarhed (tabel 4) og -fluoresceinretention (tabel 5) ved anvendelse af fire ICE-stofgrupper udføres ud fra nedenstående skalaer: Det er vigtigt at bemærke, at scorerne for cornea-opsvulmning, der vises i tabel 3, kun er relevante, hvis tykkelsen måles med et spaltelampemikroskop (f.eks. Haag-Streit BP900) med dybdemålingsanordning nr. 1 og med spaltebredden indstillet til 9 $\frac{1}{2}$, svarende til

▼M7

0,095 mm. Brugerne skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden.

Tabel 3

ICE-klassificeringskriterier for cornea-opsvulmning

Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*)	ICE-stofgruppe
0-5	I
> 5-12	II
> 12-18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12-18 (≤ 75 min. efter behandling)	III
18-26	III
> 26-32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26-32 (≤ 75 min. efter behandling)	IV
>32	IV

(*) Højeste observerede gennemsnitsscore på et hvilket som helst tidspunkt

Tabel 4

ICE-klassificeringskriterier for uklarhed

Maksimal gennemsnitlig uklarhedsscore (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Maksimal gennemsnitlig score observeret på et hvilket som helst tidspunkt (baseret på uklarhedsscorer som defineret i tabel 1).

Tabel 5

ICE-klassificeringskriterier for gennemsnitlig fluoresceinretention

Gennemsnitlig fluoresceinretentionsscore 30 minutter efter behandling (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Baseret på scorer som defineret i tabel 2.

In vitro-klassificeringen for et testkemikalie fastsættes ved at aflæse den GHS-klassificering, der svarer til kombinationen af kategorier opnået for cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention som beskrevet i tabel 6.

▼M7

Tabel 6

Overordnede in vitro-klassificeringer

UN GHS-klassificering	Kombinationer af de tre endepunkter
Uden for kategori	3 × I 2 × I, 1 × II
Ingen forudsigelse mulig	Andre kombinationer
Kategori 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Cornea-uklarhed ≥ 3 efter 30 min. (for mindst to øjne) Cornea-uklarhed = 4 på et hvilket som helst tidspunkt (for mindst to øjne) Markant løsning af epitelet (for mindst et øje)

(*) Disse kombinationer er mindre sandsynlige.

Undersøgelsesacceptkriterier

En test anses for acceptabel, hvis de samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel-/bærestofkontroller og de samtidige positive kontroller er identificeret som henholdsvis GHS uden for kategori og GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten bør omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

Testkemikalie og kontrolkemikalier

— kemisk(e) navn(e) såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes

— CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes

— renhed og sammensætning af test-/kontrolkemikalier (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige

— fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemikaliegruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse

— eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— stabilitet, hvis den kendes.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— identifikation af kilden til øjnene (f.eks. den facilitet, hvor de er indsamlet).

Betingelser for forsøgsmetoden

— beskrivelse af det anvendte testsystem

▼M7

— det anvendte spaltelampemikroskop (f.eks. model) og instrumentindstillinger for det anvendte spaltelampemikroskop

— reference til historiske negative og positive kontrolresultater og, hvis det er relevant, historiske data, der viser acceptable samtidige referencekontrolintervaller

— procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af forsøgsmetoden over tid (f.eks. periodisk test af kompetencekemikalier).

Indsamling og præparering af øjne

— donordyrenes alder og vægt og, hvis de er tilgængelige, andre særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. køn, stamme)

— opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval mellem indsamling af kyllingehovederne og anbringelse af enukleerede øjne i superfusionsapparatets kammer)

— præparering og montering af øjne, herunder specifikation af deres kvalitet, øjenkamrenes temperatur og kriterierne for udvælgelse af øjne, der anvendes til test.

Testprocedure

— antal benyttede replikater

— identiteten af de anvendte positive og negative kontroller (hvor dette er relevant også opløsningsmiddel- og benchmarkkontroller)

— dosis af testkemikalie, indgivelse og eksponeringstid

— observationstidspunkter (før og efter behandling)

— beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren.

Resultater

— opstilling i tabelform af de opnåede scorer for cornea-opsvulmning, -uklarhed og fluoresceinretention for hvert enkelt øje og på hvert observationstidspunkt, herunder den gennemsnitlige score for hvert observationstidspunkt for alle undersøgte øjne

— de højeste gennemsnitlige scorer for konstateret cornea-opsvulmning, -uklarhed og fluoresceinretention (fra et hvilket som helst tidspunkt) og den tilhørende ICE-klasse.

— Beskrivelse af eventuelle andre observationer

— den afledte in vitro GHS-klassificering

— fotografier af øjnene, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

▼**M7**

LITTERATUR

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Tilgængelig på: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm]

(4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York & Geneva, 2011. Tilgængelig på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on »The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants«. Series on Testing and Assessment, No.160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Dokument til baggrundsrevision: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M. K. og Koëter, B. W. M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Tilgængelig på: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

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

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Tilgængelig på: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

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

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Benchmarkkemikalie: Et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et benchmarkkemikalie bør have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder), ii) strukturel og funktionel lighed med den klasse af kemikalier, der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde

Bottom-up-tilgang: Trinvis tilgang til et kemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Cornea: Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

Cornea-uklarhed: Måling af graden af cornea-uigennemsigtighed efter eksponering for et testkemikalie. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea.

Cornea-opsvulmning: Objektiv måling i ICE-testen af graden af cornea-udvidelse efter eksponering for et testkemikalie. Den udtrykkes som en procentdel og beregnes ud fra basismålinger af cornea-tykkelsen (inden dosis) og tykkelsen, der registreres med regelmæssige intervaller efter eksponering for testkemikaliet i ICE-testen. Graden af cornea-opsvulmning er indikativ for beskadigelse af cornea.

Øjenirritation: Frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af testkemikaliet på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversible inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Reversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 2« (4).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fluoresceinretention: Subjektiv måling i ICE-testen af det omfang, hvori natriumfluorescein tilbageholdes af epitelceller i cornea efter eksponering for et teststof. Graden af fluoresceinretention er indikativ for beskadigelse af cornea-epitelet.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Irreversible virkninger på øjet: se »Alvorlig øjenskade« og »UN GHS-kategori 1«.

▼M7

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (4).

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Ikke klassificeret: Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende (UN GHS-kategori 2) eller som forårsagende alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1). Udskiftelige med »UN GHS uden for kategori«.

Positiv kontrol: Replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den svære respons ikke være overdrevent stor.

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Reversible virkninger på øjet: se »Øjenirritation« og »UN GHS-kategori 2«.

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Irreversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 1« (4).

Spaltelampemikroskop: Instrument, som anvendes til direkte undersøgelse af øjet under forstørrelse tilvejebragt af et binokulært mikroskop ved frembringelse af et stereoskopisk, retvendt billede. Ved ICE-forsøgsmetoden anvendes dette instrument til at se kyllingeøjets anteriore strukturer samt til at foretage objektive målinger af corneas tykkelse ved at påmontere en anordning til dybdemåling.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (4).

Overfladeaktivt stof (surfactant): Også kaldet overfladeaktivt stof. Et stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer. Kaldes også for befugtningsmiddel.

▼M7

Top-down-tilgang: Trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

Testkemikalie: Ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvise teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (4).

UN GHS-kategori 1: se »Alvorlig øjenskade« og/eller »Irreversible virkninger på øjet«.

UN GHS-kategori 2: se »Øjenirritation« og/eller »Reversible virkninger på øjet«.

UN GHS uden for kategori: Stoffer, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Udskiftelig med »Ikke-klassificeret«.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

»Weight-of-the-evidence«: Proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

▼M7

Tillæg 2

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL ICE-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en forsøgsmetode, der følger denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenrisikoklassificeringen for de 13 anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for øjenrisiko, der er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405) og FN's GHS-klassificeringssystem (dvs. UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (4) (6). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der findes tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for ICE in vitro-metoden. Referencedata findes i SSD (5) og i ICCVAM Background Review Documents for ICEBCOP-forsøgsmetoden og for isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-forsøgsmetoden) (9).

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af ICE

Kemikalie	CASRN	Kemikaliegruppe (1)	Fysisk form	In vivo-klassificering (2)	In vitro-klassificering (3)
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Trichloreddikesyre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dichlor-benzoyl-chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser (4)
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2A (5)	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser (4)
Ethyl-2-methylaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser (4)
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Uorganisk svovlforbindelse.	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori (grænsetilfælde)
Methylcyclopentan	96-37-7	Carbonhydrid (cyklisk)	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori
n-hexan	110-54-3	Carbonhydrid (acyklisk)	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori

▼**M7**

Kemikalie	CASRN	Kemikaliegruppe ([1])	Fysisk form	In vivo-klassificering ([2])	In vitro-klassificering ([3])
Triacetin	102-76-1	Lipid	Flydende	Ikke klassificeret	Uden for kategori

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

([1]) Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: http://www.nlm.nih.gov/mesh)

([2]) Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (4) (6).

([3]) Baseret på resultater fra ICE som beskrevet i tabel 6.

([4]) Kombination af andre ICE-scorer end dem, der er beskrevet i tabel 6 for identifikation af GHS uden for kategori og GHS-kategori 1 (se tabel 6)

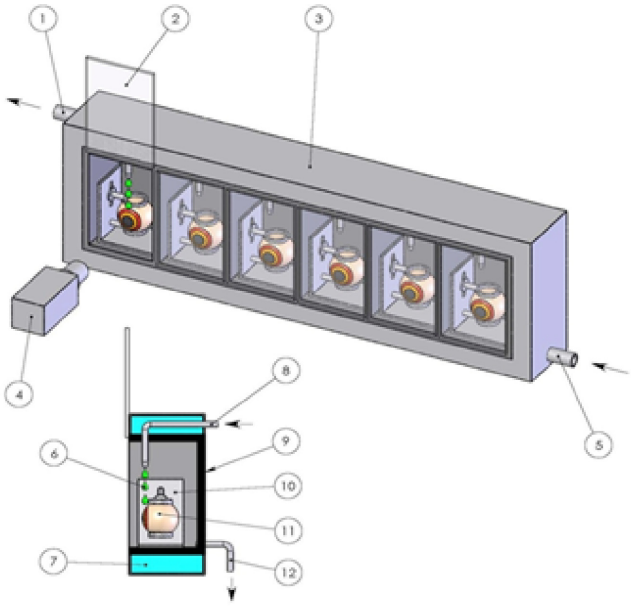
([5]) Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for at skelne mellem disse to kategorier, dvs. 1 ud af 3 mod 2 ud af 3 dyr med virkninger på dag 7 er nødvendige for at opnå en kategori 2A-klassifikation. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle endepunkter bortset fra conjunctiva-rødme hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Den ene dyr, som var kommet sig fuldstændig på dag 7, havde en score for conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7), med fuld bedring på dag 10.

▼M7

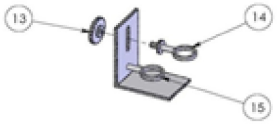
Tillæg 3

DIAGRAMMER OVER ICE-SUPERFUSIONSAPPARATET OG ØJENHOLDERNE

(Se Burton et al. (18) for yderligere generiske beskrivelser af superfusionsapparatet og øjenholderen)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Punkt nr.	Beskrivelse	Punkt nr.	Beskrivelse
1	Udtag til varmt vand	9	Kammer
2	Skydedør	10	Øjenholder
3	Superfusionsapparat	11	Kyllingeøje
4	Optisk måleinstrument	12	Udtag til saltopløsning
5	Tilførsel af varmt vand	13	Stilleskrue
6	Saltopløsning	14	Justerbar øvre arm
7	Varmt vand	15	Fast nedre arm
8	Tilførsel af saltopløsning		

▼M7

B.49. *IN VITRO*-MIKROKERNETEST I PATTEDYRCELLER

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 487 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

En in vitro-mikrokernetest (MNvit-test) er en genotoksicitetstest til påvisning af mikrokerner (MN) i cytoplasma i interfaseceller. Mikrokerner kan dannes ud fra acentriske kromosomfragmenter (dvs. uden en centromer), eller hele kromosomer, som ikke kan migrere til polerne under celledelingens anafase. Derfor er en MNvit-test en in vitro-metode, der danner et solidt grundlag for in vitro-undersøgelse af potentialet for kromosomskader, da både aneugener og klastogener kan påvises (2) (3) i celler, der har delt sig under eller efter eksponering for testkemikaliet (se punkt 13 for yderligere oplysninger). Mikrokerner er skader, der er blevet overført til datterceller, hvorimod kromosomaberrationer, der er scoret i metafaseceller, ikke nødvendigvis er overført. I begge tilfælde overlever cellerne muligvis ikke disse ændringer.

I denne forsøgsmetode kan der anvendes protokoller med og uden aktinpolymeriseringsinhibitoren cytochalasin B (cytoB). Tilsætning af cytoB inden mitosen giver celler, der er binukleære, og giver derfor mulighed for identifikation og analyse af mikrokerner kun i de celler, der har afsluttet en mitose (4) (5). I denne forsøgsmetode kan der desuden anvendes protokoller uden cytokineseblokerende stof, hvis det kan dokumenteres, at den analyserede cellepopulation har undergået mitose.

Ud over anvendelse af MNvit-testen til identifikation af kemikalier, der inducerer mikrokerner, kan anvendelsen af immunkemisk mærkning af kinetokorer eller hybridisering med centromeriske/telomeriske prober (fluorescerende in situ-hybridisering (FISH)) tilvejebringe yderligere oplysninger om mekanismerne ved kromosomskade og mikrokernedannelse (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Disse mærknings- og hybridiseringsprocedurer kan anvendes i tilfælde af øget mikrokernedannelse, hvis forsøgslederen ønsker at bestemme, hvorvidt forøgelsen skyldtes klastogene og/eller aneugene hændelser.

Da mikrokerner i interfaseceller kan vurderes forholdsvis objektivt, behøver laboratoriepersonalet kun bestemme antallet af binukleære celler ved anvendelse af cytoB og hyppigheden af mikronukleære celler i alle tilfælde. Objektglassene kan derfor scores relativt hurtigt, og analysen kan automatiseres. Det gør det praktisk at score tusindvis i stedet for hundredvis af celler pr. behandling, hvilket øger testens power. Da mikrokerner kan dannes ud fra tiloversblevne kromosomer, er det endelig muligt at påvise aneuploidiinducerende stoffer, som er vanskelige at undersøge i konventionelle test for kromosomaberrationer, f.eks. kapitel B.10 i dette bilag (18). MNvit-testen, som beskrives i denne forsøgsmetode, giver dog ikke mulighed for at differentiere kemikalier, der forårsager ændringer i kromosomtal, og/eller ploidinducerende kemikalier fra klastogenicitetinducerende kemikalier uden særlige teknikker såsom FISH, der er beskrevet i punkt 4.

MNvit-testen er solid, kan udføres på en lang række celletyper og kan anvendes til påvisning af forekomst eller fravær af cytoB. Der findes omfattende data til støtte for gyldigheden af MNvit-testen med forskellige celletyper (kulturer af cellelinjer eller primære cellekulturer) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Det gælder bl.a. internationale

▼M7

valideringsundersøgelser, der koordineres af Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), og de rapporter, som er udarbejdet af International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). De tilgængelige data er desuden blevet revurderet i forbindelse med en retrospektiv weight-of-evidence-undersøgelse gennemført af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) under Europa-Kommissionen, og ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) har godkendt forsøgsmetoden som videnskabeligt underbygget (37) (38) (39).

I MNvit-testen af pattedyrceller kan der benyttes kulturer af cellelinjer eller primære cellekulturer af human oprindelse eller gnaveroprindelse. Da baggrundsforekomsten af mikrokerner vil påvirke testens følsomhed, anbefales det, at der anvendes celletyper med en stabil og fastlagt baggrundsforekomst af mikrokernedannelse. Cellerne udvælges på grundlag af deres evne til at vokse godt ved dyrkning, karotypens stabilitet (herunder kromosomtal) og hyppigheden af spontane mikrokerner (40). På nuværende tidspunkt gør de tilgængelige data det ikke muligt at fremsætte konkrete anbefalinger, men viser, at det i forbindelse med vurdering af kemiske farer er vigtigt at tage højde for status af p53, genetisk (karotypens) stabilitet, DNA-reparationskapacitet og oprindelse (gnavere eller mennesker) af de celler, der er udvalgt til test. Brugerne af denne forsøgsmetode opfordres således til at overveje, hvilken indflydelse disse og andre celleegenskaber har på, hvordan en cellelinje kan afsløre induktion af mikrokerner, da viden på dette område hele tiden udvikler sig.

De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen kilde til metabolisk aktivering, medmindre cellerne er metabolisk kompetente i forhold til testkemikalierne. Metabolismeaktiveringssystemet efterligner ikke in vivo-betingelserne fuldstændig. Man må omhyggeligt undgå betingelser, der kan føre til artefakte positive resultater, der ikke afspejler testkemikaliernes genotoksicitet. Disse betingelser omfatter ændringer i pH (41) (42) (43) eller osmolalitet, interaktion med celledyrkningsmediet (44) (45) eller for høje niveauer af cytotoksicitet (se punkt 29).

Ved analyse af induktion af mikrokerner er det afgørende, at både behandlede og ubehandlede kulturer har gennemgået mitose. Den mest informative fase for scoring af mikrokerner er i celler, som har afsluttet mitosen under eller efter behandling med testkemikaliet. For fremstillede nanomaterialer er der behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men de er ikke beskrevet i denne forsøgsmetode.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

Cellekulturer fra mennesker eller andre pattedyr eksponeres for testkemikaliet både med og uden en eksogen metabolisk aktiveringskilde, medmindre der anvendes celler med tilstrækkelig metaboliseringsevne (se punkt 19).

Under eller efter eksponering for testkemikaliet dyrkes cellerne længe nok til, at kromosomskade eller andre indvirkninger på cellecyklussen/celledelingen medfører dannelse af mikrokerner i interfaseceller. Ved induktion af aneuploidi

▼M7

bør testkemikaliet normalt være til stede under mitosen. Høstede og farvede interfaseceller analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner. Ideelt set bør mikrokerner kun scores i celler, som har afsluttet mitosen under eksponering for testkemikaliet eller i påkommende tilfælde i perioden efter behandlingen. I kulturer, som er blevet behandlet med et cytokineseblokerende stof, gøres dette nemt ved kun at score binukleære celler. Såfremt der ikke anvendes et cytokineseblokerende stof, er det vigtigt at påvise, at det er sandsynligt, at de analyserede celler har delt sig, hvilket baseres på en stigning i cellepopulationen under eller efter eksponering for testkemikaliet. For alle protokoller er det vigtigt at påvise, at der er sket celleproliferation i både kontrolkulturerne og de behandlede kulturer, og omfanget af den testkemikalieinducerede cytotoksicitet eller cytostase bør vurderes i alle kulturer, som scores for forekomst af mikrokerner.

BESKRIVELSE AF METODEN

Celler

Der kan anvendes dyrkede primære perifere blodlymfocytter fra mennesker eller andre pattedyr (7) (20) (46) (47) og en række cellelinjer fra gnavere såsom CHO-, V79-, CHL/IU- og L5178Y-celler eller andre humane cellelinjer som TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (se punkt 6). Andre cellelinjer såsom HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-celler (52) (53), A549 og primære embryoceller fra syrisk hamster (54) er blevet anvendt til mikrokernetest, men er endnu ikke blevet grundigt valideret. Anvendelsen af disse cellelinjer og -typer bør derfor være baseret på dokumenteret ydeevne i testen som beskrevet i afsnittet om acceptkriterier. Cyto B blev rapporteret som havende potentiel indflydelse på L5178Y-cellevækst og kan derfor ikke anbefales til denne cellelinje (23). Når der anvendes primære celler, bør det af hensyn til dyrevelfærden overvejes at anvende celler fra mennesker, hvis det er muligt, og disse bør indsamles i overensstemmelse med menneskelige etiske principper og regler.

Perifere blodlymfocytter fra mennesker bør udtages fra unge (ca. 18-35 år), ikkerygende personer uden kendt sygdom eller nylige eksponeringer for genotoksiske stoffer (f.eks. kemikalier, ioniserende stråling) i et niveau, der vil øge baggrundsforekomsten af mikrokerneceller. Det vil sikre en lav og konsekvent baggrundsforekomst af mikrokerneceller. Den grundlæggende forekomst af mikrokerneceller stiger med alderen, og denne tendens er mere markant hos kvinder end hos mænd (55). Hvis celler fra mere end en donor pooles, bør antallet af donorer angives. Det er nødvendigt at påvise, at cellerne er delt fra begyndelsen af behandlingen med testkemikaliet til prøveudtagning. Cellekulturer fastholdes i en eksponentiel vækstfase (cellelinjer) eller stimuleres til at dele sig (primære kulturer af lymfocytter) for at eksponere cellerne på forskellige stadier af cellecyklussen, da cellefasernes følsomhed over for testkemikalierne muligvis ikke kendes. De primære celler, der skal stimuleres med mitogenstoffer for at dele sig, synkroniseres generelt ikke længere under eksponering for testkemikaliet (f.eks. humane lymfocytter efter 48 timers stimulering med mitogen). Det frarådes at bruge synkroniserede celler under behandlingen med testkemikaliet, men det kan accepteres, såfremt det er berettiget.

Medier og dyrkningsbetingelser

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsflasker, fugtig atmosfære på 5 % CO_2, hvor det er relevant, temperatur på 37 °C). Cellelinjerne kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtal og fravær af mykoplasmakontaminering, og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det karakteristiske kromosomtal har ændret sig, anvendes cellerne ikke. Den normale cyklustid for cellelinjer eller primære kulturer, der benyttes i laboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber.

▼M7

Fremstilling af kulturer

Cellelinjer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt, indtil de høstes (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

Lymfocytter: Fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller fraseparerede lymfocytter dyrkes (f.eks. i 48 timer for humane lymfocytter) med tilstedeværelse af et mitogen [f.eks. phytohæmagglutinin (PHA) for humane lymfocytter] for at fremkalde celledeling inden eksponering for testkemikaliet og cytoB.

Metabolisk aktivering

Eksogene metaboliserende systemer anvendes, når der gøres brug af celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der anbefales som standard, medmindre der er begrundelse for at anvende et andet system, er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra gnavere (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (56) (57) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (58) (59) (60). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (61) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med blandet funktion (58) (59) (60). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Brug af produkter, der nedsætter mitoseindekset, især calciumkompleksdannere (62), bør undgås under behandlingen. Valget af type og koncentration af exogent metabolismeaktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af den testede kemikaliegruppe.

Præparering af testkemikaliet

Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og fortyndes eventuelt inden behandling af cellerne. Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede flasker (63) (64) (65). Der bør laves præparater af testkemikaliet lige inden behandlingen, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt.

Testbetingelser

Opløsningsmidler

Opløsningsmidlet vælges for at optimere testkemikaliets opløselighed uden at påvirke assayets adfærd negativt, f.eks. ændring af cellevækst, påvirkning af testkemikaliets integritet, reaktion med dyrkningsflasker eller blokering af metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er vand eller dimethylsulfoxid (DMSO). Generelt bør organiske opløsningsmidler ikke overstige 1 % (v/v). Hvis cytoB opløses i DMSO, bør den samlede mængde organiske opløsningsmidler, der anvendes til både testkemikaliet og cytoB, ikke overstige 1 % (v/v); ellers bør ubehandlede kontrolgrupper anvendes for at sikre, at andelen af organisk opløsningsmiddel ikke har nogen negativ indvirkning. Vandige opløsningsmidler (saltvand eller vand) må ikke overstige 10 % (v/v) i det færdige behandlingsmedium. Hvis der anvendes andet end ikke-veletablerede opløsningsmidler (f.eks. ethanol eller acetone), bør de underbygges af kompatibilitetsdata med testkemikaliet, testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Uden disse understøttende data er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (se tillæg 1) samt

▼M7

kontroller af opløsningsmidlet for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke forårsager skadevirkninger eller kromosomvirkninger (f.eks. aneuploide eller klastogene virkninger).

Anvendelse af cytoB som cytokineseblokerende stof

Et af de vigtigste aspekter i forbindelse med MNvit-testen er at sikre, at de scorede celler har afsluttet mitosen under behandlingen eller i påkommende tilfælde i inkubationsperioden efter behandlingen. Scoringen af mikrokernerne bør således begrænses til celler, der har undergået mitose under eller efter behandling. CytoB har været det mest anvendte stof til at hæmme cytokinese, da det hæmmer samlingen af aktin og således forhindrer deling af datterceller efter mitose, hvilket resulterer i dannelsen af binukleære celler (6) (66) (67). Testkemikaliets indvirkning på celleproliferationens kinetik kan måles samtidigt, når der anvendes cytoB. CytoB bør anvendes som cytokineseblokerende stof, når der gøres brug af humane lymfocytter, da cellecykluslængder varierer mellem donorer, og da det ikke er alle lymfocytter, der reagerer på PHA-stimulation. CytoB er ikke obligatorisk for andre celletyper, hvis det kan fastslås, at de har delt sig som beskrevet i afsnit 27. Desuden bruges cytoB generelt ikke, når prøver bedømmes for mikrokerner med flowcytometriske metoder.

Laboratoriet bør vælge den passende koncentration af cytoB for hver celletype for at opnå den optimale forekomst af binukleære celler i kontrolkulturerne med opløsningsmiddel, og det bør påvises, at den giver et godt udbytte af binukleære celler til scoring. Den passende koncentration af cytoB ligger normalt mellem 3 og 6 μg/ml (19).

Måling af celleproliferation og cytotoksicitet og valg af behandlingskoncentrationer

Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør man undgå koncentrationer, der kan frembringe artefakt positiv respons, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksicitet (se punkt 29), udfældning i dyrkningsmediet (se punkt 30) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (se punkt 9). Hvis testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-værdien justeres ved bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå et artefakt positivt resultat og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

Målinger af celleproliferation foretages for at sikre, at tilstrækkeligt mange behandlede celler har undergået mitose under testen, og at behandlingerne udføres med passende cytotoksicitet (se punkt 29). Cytotoksiciteten bestemmes i hovedforsøget med og uden metabolismeaktivering ved hjælp af en passende indikator for celledød og -vækst (se punkt 26 og 27). Selv om det kan være nyttigt at evaluere cytotoksicitet ved en indledende foreløbig test for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, er en indledende test ikke obligatorisk. Hvis en sådan test udføres, bør den ikke erstatte måling af cytotoksicitet i hovedforsøget.

Behandling af kulturer med cytoB og måling af de relative forekomster af mononukleære, binukleære og multinukleære celler i kulturen er en nøjagtig metode til kvantificering af indvirkningen på celleproliferationen og en behandlings cytotoksiske eller cytostatiske virkning (6) og sikrer, at det udelukkende er

▼M7

celler, som delte sig under eller efter behandling, der scores ved mikroskopering. Proliferationsindekset for cytokineseblokering (CBPI) (6) (27) (68) eller replikationsindekset (RI) ud fra mindst 500 celler pr. kultur (se formlerne i tillæg 2) anbefales til at vurdere den cytotoksiske og cytostatiske virkning af en behandling gennem sammenligning af værdier i de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. Vurdering af andre indikatorer for cytotoksicitet (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, antal metafaser, cellecyklus) vil kunne give nyttige oplysninger, men bør ikke anvendes i stedet for CBPI eller RI.

I undersøgelser uden cytoB er det nødvendigt at påvise, at cellerne i kulturen har delt sig, således at en betydelig andel af de scorede celler er blevet delt under eller efter behandling med testkemikaliet, idet der i modsat fald kan fremkaldes en falsk negativt respons. Måling af relativ populationsfordobling (RPD) eller relativ forøgelse af celletal (RICC) anbefales til at vurdere den cytotoksiske og cytostatiske virkning af en behandling (17) (68) (69) (70) (71) (se formlerne i tillæg 2). Ved udvidede prøveudtagningstidspunkter (f.eks. behandling af 1,5-2 gange normal cellecykluslængde og høst efter yderligere 1,5-2 gange normal cellecykluslængde, som medfører prøveudtagningstidspunkter, der er 3-4 gange længere end de samlede normale cellecykluslængder som beskrevet i punkt 38 og 39), kan RPD medføre, at cytotoksiciteten undervurderes (71). Under disse omstændigheder kan RICC være et bedre mål, eller evaluering af cytotoksicitet efter 1,5-2 gange normal cellecykluslængde kan være et nyttigt estimat. Vurdering af andre cytotoksicitets- eller cytostasemarkører (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, antal metafaser, proliferationsindeks (PI) cellecyklus, nukleoplasmiske broer eller kerneknopper) vil kunne give nyttige oplysninger, men bør ikke anvendes i stedet for hverken RPD eller RICC.

Mindst tre testkoncentrationer (herunder ikke opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (passende cytotoksicitet, antal celler mv.), bør vurderes. Uanset hvilke typer celler (cellelinjer eller primærkulturer af lymfocytter), det drejer sig om, kan der ved hver af de testede koncentrationer anvendes enten replikate eller enkelte behandlede kulturer. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, accepteres anvendelse af enkeltkulturer også, forudsat at det samme totale celleantal scores i enten enkeltkulturer eller dublikate kulturer. Brug af enkeltkulturer er især relevant ved vurdering af mere end tre koncentrationer (jf. punkt 44-45). De resultater, der er opnået fra uafhængige replikate kulturer i en given koncentration, kan samles med henblik på dataanalyse. For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoksicitet, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoksicitet, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra det, der frembringer cytotoksicitet som beskrevet i punkt 29, til koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoksicitet. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentrationsresponskurver, og for at indhente data ved lav og moderat cytotoksicitet eller undersøge dosis/respons-forholdet nærmere vil det være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og/eller mere end tre koncentrationer (enkeltkulturer eller replikater) — navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 60).

Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoksicitet, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå 55 ± 5 % cytotoksicitet ved hjælp af de anbefalede cytotoksicitetsparametre (dvs. reduktion af RICC og RPD for cellelinjer, når cytoB ikke anvendes, og reduktion af CBPI eller RI, når cytoB anvendes, til 45 ± 5 % af den sideløbende negative kontrol) (72). Man bør være forsigtig med fortolkningen af positive resultater, der kun findes i den høje ende af dette område for cytotoksicitet på 55 ± 5 % (71).

▼M7

For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoksiske ved koncentrationer, der er lavere end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller ved hjælp af et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliet. Selv om der forekommer cytotoksicitet over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun en koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen (f.eks. farvning eller scoring). Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoksicitet, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (73) (74) (75). Når teststoffets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) (76), miljømæssige udtræk mv., kan det være nødvendigt at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoksicitet for at øge koncentrationen af de enkelte komponenter. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (93).

Kontroller

Der bør i hver høst indgå samtidige negative kontroller (se punkt 21), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.

Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere klastogener og aneugener i henhold til testprotokollen, og effektiviteten af det exogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolkemikalier kan anvendes, hvis der er belæg for det.

For indeværende er der ingen kendte aneugener, som kræver metabolisk aktivering, for at deres genotoksiske virkninger kan bedømmes (17). Eftersom in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede til kortvarige behandlinger, der udføres samtidig med og uden metabolisk aktivering af samme behandlingsvarighed, kan brugen af positive kontroller begrænses til en klastogen, som kræver metabolisk aktivering. I dette tilfælde vil en enkelt positive kontrolrespons hos klastogenet påvise såvel aktiviteten hos det metaboliske aktiveringssystem som testsystemets reaktionsevne. Langtidsbehandling (uden S9) bør dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolisk aktivering. Hvis et klastogen er valgt som fælles positiv kontrol for kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering, bør der vælges et aneugen til langvarig behandling uden metabolisk aktivering. Positive kontrolprøver for både klastogenicitet og aneugenicitet bør anvendes i metabolisk kompetente celler, som ikke kræver S9.

Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed (dvs. virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem), og responsen bør ikke kompromitteres på grund af cytotoksicitet, der overskrider de grænser, der er fastsat i denne forsøgsmetode.

▼M7

Tabel 1

Anbefalede referencekemikalier til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelsen af positive kontroller

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. **Aktive klastogener uden metabolisk aktivering**		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-Oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. **Klastogener, som kræver metabolisk aktivering**		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclofosfamid	50-18-0
3. **Aneugener**		
	Colchicin	64-86-8
	Vinblastin	143-67-9

FREMGANGSMÅDE

Behandlingsplan

For at maksimere sandsynligheden for at påvise aneugeners eller klastogeners aktivitet i en bestemt fase af cellecyklussen er det vigtigt, at et tilstrækkeligt antal celler, der repræsenterer de forskellige faser i deres cellecyklusser, behandles med testkemikaliet. Alle behandlinger bør indledes og afsluttes, mens cellerne vokser eksponentielt, og cellernes vækst bør fortsætte frem til prøveudtagningstidspunktet. Behandlingsplanen for cellelinjer og primære cellekulturer kan derfor være forskellig fra behandlingsplanen for lymfocytter, der kræver stimulering med mitogen for at sætte cellecyklussen i gang (17). For lymfocytter er den mest effektive metode at indlede behandlingen med testkemikaliet 44-48 timer efter PHA-stimulering, hvor cellerne vil dele sig asynkront (6).

Offentliggjorte data (19) viser, at de fleste aneugener og klastogener vil blive påvist efter en kortvarig behandlingsperiode på 3-6 timer med eller uden tilsætning af S9, efterfølgende fjernelse af testkemikaliet og prøveudtagning på et tidspunkt, der svarer til omkring 1,5-2 gange en normal cellecyklus, når behandlingen er indledt (7).

For en grundig evaluering, som vil være nødvendig for at få et negativt resultat, bør alle tre følgende forsøgsbetingelser dog gennemføres med en kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering og langtidsbehandling uden metabolisk aktivering (jf. punkt 56, 57 og 58):

— Cellerne bør udsættes for testkemikaliet uden metabolisk aktivering i 3-6 timer, og prøven udtages efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (19),

— Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet med metabolisk aktivering i 3-6 timer, og prøven udtages efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (19),

▼M7

— Celler bør kontinuerligt eksponeres uden metabolisk aktivering indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange normal cellecykluslængde.

I tilfælde af, at en af ovenstående forsøgsbetingelser fører til et positivt svar, er det muligvis ikke nødvendigt at undersøge nogen af de andre behandlinger.

Hvis man ved eller har mistanke om, at testkemikaliet påvirker cellecykluslængden (f.eks. ved test af nucleosidanaloger), navnlig for p53-kompetente celler (35) (36) (77), kan prøveudtagnings- og restitutionsperioden forlænges med op til yderligere 1,5-2,0 gange de normale cellecykluslængder (dvs. i alt 3,0-4,0 gange cellecykluslængden efter påbegyndelsen af korttids- og langtidsbehandlinger). Med disse valgmuligheder tages der højde for situationer, der kan give anledning til bekymring over risikoen for interaktion mellem testkemikaliet og cytoB. Ved brug af udvidede prøveudtagningstidspunkter (dvs. en dyrkningstid på i alt 3,0-4,0 gange cellecykluslængden), bør det sikres, at cellerne stadig deler sig aktivt. For lymfocytter kan den eksponentielle vækst f.eks. kan være faldende 96 timer efter stimulering, og etlagscellekulturer kan flyde sammen.

De anbefalede behandlingsplaner er sammenfattet i tabel 2. Disse generelle behandlingsplaner kan ændres (og bør begrundes) afhængigt af testkemikaliets stabilitet eller reaktivitet eller de anvendte cellers særlige vækstegenskaber.

Tabel 2

Tidsplan for cellebehandling og høst for MNvit-testen

Lymfocytter, primærceller og cellelinjer behandlet med cytoB	+ S9 Kort behandling	Behandl i 3-6 timer med tilsætning af S9. Fjern S9 og behandlingsmediet. Tilsæt frisk medium og cytoB. Høst 1,5-2,0 gange normal cellecykluslængde efter behandlingsstart.
	– S9 Kort behandling	Behandl i 3-6 timer. Fjern behandlingsmediet. Tilsæt frisk medium og cytoB. Høst 1,5-2,0 gange normal cellecykluslængde efter behandlingsstart.
	– S9 Forlænget behandling	Behandl i 1,5-2 gange normal cellecykluslængde med tilsætning af cytoB. Høst ved afslutningen af behandlingsperioden.
Cellelinjer behandlet uden cytoB (Samme behandlingsplan som anført ovenfor, bortset fra at der ikke tilsættes cytoB)		

I encellede kulturer kan der være mitotiske celler (runde celler, der er løsrevet fra overfladen) til stede efter eksponeringen på 3-6 timer. Da disse mitotiske celler let løsrives, kan de gå tabt, når mediet med testkemikaliet fjernes. Hvis der er grund til at tro, at der sker en betydelig stigning i antallet af mitotiske celler i forhold til kontrollerne, hvilket tyder på en sandsynlig mitosestandsning, bør cellerne indsamles ved centrifugering og tilsættes kulturerne på ny for ikke at miste celler, der er i mitose, og hvor der er risiko for mikrokerne-/kromosomaberration på høsttidspunktet.

▼M7

Cellehøst og præparering af objektglas

Høst og præparering bør foregå særskilt for hver enkelt kultur. Præpareringen af celler kan bestå i hypotonisk behandling, men dette er ikke nødvendigt, hvis der opnås en tilstrækkelig spredning af cellerne på anden vis. Der kan anvendes forskellige teknikker til præparering af objektglas, forudsat at der fremstilles cellepræparater af høj kvalitet til scoring. Celler med intakt cellemembran og intakt cytoplasma anvendes til påvisning af mikrokerner og (ved cytokineseblokeringsmetoden) pålidelig identifikation af binukleære celler.

Objektglassene kan farves ved hjælp af forskellige metoder, f.eks. med Giemsa- eller fluorescerende DNA-specifikke farvestoffer. Ved at bruge en DNA-specifik fluorescerende farve (f.eks. acridinorange (78) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) kan man undgå nogle af de artefakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Anti-kinetokor-antistoffer, FISH med pancentromeriske DNA-prober eller primet in situ-mærkning med pancentromerspecifikke primere og egnet DNA-kontrastfarvning kan anvendes til identifikation af mikrokerners indhold (hele kromosomer vil blive farvet, mens acentriske kromosomfragmenter ikke vil), hvis der er brug for mekanistisk information om dannelsen heraf (16) (17). Andre metoder til differentiering mellem klastogener og aneugener kan anvendes, hvis de har vist sig at være effektive og er validerede. For visse cellelinjer kan målinger af sub-2N-kerner som hypodiploid-hændelser ved hjælp af teknikker såsom billedanalyse, laserskanningcytometri eller flowcytometri også give nyttige oplysninger (80) (81) (82). Endvidere kan morfologiske observationer af celler give et fingerpeg om mulig aneuploidi. Desuden kan en test for metafasekromosomaberrationer, helst på samme celletype og protokol med tilsvarende følsomhed, også være en nyttig metode til at afgøre, om mikrokerner skyldes kromosomskade (velvidende at kromosomtab vil ikke blive opdaget ved kromosomaberrationstesten).

Analyse

Alle objektglas, herunder med opløsningsmiddel og ubehandlede (hvis disse anvendes) og positive kontroller, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen til påvisning af hyppigheden af mikrokerner. Egnede metoder bør anvendes til at kontrollere eventuelle systematiske fejl (bias) eller afvigelser ved brug af et automatisk scoringssystem, f.eks. flowcytometri, laserskanningcytometri eller billedanalyse. Uanset hvilken elektronisk platform, der anvendes til at optælle mikrokerner, bør CBPI, RI, RPD eller RICC vurderes samtidigt.

I cytoB-behandlede kulturer analyseres mikrokerneforekomsten i mindst 2 000 binukleære celler pr. koncentration og kontrol (83) ligeligt fordelt mellem replikaterne, hvis der anvendes replikater. Hvis der kun er en kultur pr. dosis (se punkt 28), bør mindst 2 000 binukleære celler pr. kultur (83) scores i denne ene kultur. Hvis der er væsentligt færre end 1 000 binukleære celler pr. kultur (for duplikate kulturer), eller færre end 2 000 (hvis der kun benyttes en kultur) til scoring i hver koncentration, og hvis der ikke påvises en væsentlig forøgelse af antallet af mikrokerner, gentages testen med flere celler eller i mindre cytotoksiske koncentrationer afhængigt af forholdene. Man bør være omhyggelig med ikke at score binukleære celler med uregelmæssige former, eller celler hvor størrelsen af de to kerner er meget forskellig. Desuden må binukleære celler ikke forveksles med multinukleære celler med ringe spredning. Celler med mere end to hovedkerner bør ikke analyseres for mikrokerner, da basisforekomsten af mikrokerner kan være højere i disse celler (84). Scoring af mononukleære celler accepteres, hvis testkemikaliet har vist sig at gribe ind i cytoB-aktiviteten. I

▼M7

sådanne tilfælde kan en ny test uden cytoB være nyttig. Scoring af mononukleære celler som supplement til binukleære celler vil kunne give nyttige oplysninger (85), (86), men er ikke obligatorisk.

I cellelinjer, der er testet uden cytoB-behandling, scores mikrokernerne i mindst 2 000 celler pr. testkoncentration og kontrol (83) ligeligt fordelt mellem replikaterne, hvis der anvendes replikater. Benyttes der kun en kultur pr. koncentration (jf. punkt 28), bør mindst 2 000 celler pr. kultur scores i denne ene kultur. Hvis der er væsentligt færre end 1 000 celler pr. kultur (for duplikate kulturer), eller færre end 2 000 (hvis der kun benyttes en kultur), til bedømmelse i hver koncentration, og hvis der ikke påvises en væsentlig forøgelse af antallet af mikrokerner, gentages testen med flere celler eller i mindre cytotoksiske koncentrationer afhængigt af forholdene.

Når cytoB anvendes, bestemmes CBPI eller RI til vurdering af celleproliferationen (se tillæg 2) ud fra mindst 500 celler pr. kultur. Ved behandling uden tilsætning af cytoB er det afgørende at dokumentere, at cellerne i kulturen har delt sig, jf. punkt 24-28.

Laboratoriets kompetencer

Med henblik på at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige erfaringer med assayet, inden det anvendes til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive kemikalier, der fungerer via forskellige mekanismer (mindst en med og en uden metabolisk aktivering og en via en aneugen mekanisme, der er udvalgt blandt de kemikalier, der er opført i tabel 1) og forskellige negative kontroller (herunder ubehandlede kulturer og forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 49-52.

Et udvalg af positive kontrolkemikalier (jf. tabel 1) bør undersøges med korte og lange behandlinger uden metabolisk aktivering samt med kort behandling med metabolisk aktivering med henblik på at kunne påvise kompetence i sporing af klastogene og aneugene kemikalier, vurdere effektiviteten af systemet til metabolisk aktivering og påvise relevansen af scoringsprocedurerne (visuel mikroskoperingsanalyse, flowcytometri, laserscanningcytometri eller billedanalyse). Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte kemikalier, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

Laboratoriet bør fastlægge:

— et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling

— et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte negative kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (87) (88). Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men skal helst bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (88)) til at identificere, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, og vise, at metodologien er »under kontrol« i deres laboratorium (83). Yderligere anbefalinger til, hvordan

▼M7

man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (87).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om dataene stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

Negative kontroldata bør bestå af forekomsten af celler med mikrokerner fra en enkelt kultur eller summen af replikate kulturer som beskrevet i punkt 28. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase (87) (88). Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er »under kontrol« (jf. punkt 50), og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

Ved cytokineseblokeringsmetoden tages der kun højde for forekomsten af binukleære celler med mikrokerner (uafhængigt af antallet af mikrokerner pr. celle) ved vurdering af induktionen af mikrokerner. Det er ikke obligatorisk at score antallet af celler med en, to eller flere mikrokerner, som kan rapporteres særskilt, men det kan give nyttige oplysninger.

Der foretages sideløbende målinger af cytotoksicitet og/eller cytostase for alle behandlede kulturer samt positive og negative kontrolkulturer (16). Ved cytokineseblokeringsmetoden udregnes CBPI eller RI for alle behandlede kulturer og kontrolkulturer som målinger af cellecyklusforsinkelse. Hvis cytoB ikke anvendes, anvendes RPD- eller RICC-metoden (se tillæg 2).

Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

— Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase som beskrevet i punkt 50.

— Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 50) skal fremkalde responser, der er forenelige med responserne i laboratoriets historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Celleproliferationskriterier i opløsningsmiddelkontrollen bør være opfyldt (punkt 25-27).

— Alle forsøgsbetingelser er blevet testet, medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 36-40).

— Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (punkt 28 og 44-46).

▼M7

— Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 24-31.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 36-39):

— Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol (89).

— Stigningen er dosisafhængig i mindst et forsøg, når den vurderes med en hensigtsmæssig trend test (se punkt 28).

— Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 52).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliet for at kunne fremkalde kromosomskader og/eller tilvækst eller tab i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (90) (91) (92).

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 36-39):

— Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

— Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend test.

— Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 52).

Testkemikaliet anses herefter for ikke at kunne fremkalde kromosomskader og/eller tilvækst eller tab i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (90) (91) (92).

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv som beskrevet ovenfor og/eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Scoring af yderligere celler (hvor det er relevant) eller et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) kan være nyttigt.

I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at resultaterne er tvetydige.

Når testkemikalier inducerer mikrokerner i MNvit-testen, kan det skyldes, at de fremkalder kromosombrud, kromosomtab eller en kombination heraf. Yderligere analyser med anvendelse af anti-kinetokor-antistoffer, centromeriske in situ-prober eller andre metoder kan anvendes til at bestemme, hvorvidt induktionen af mikrokerner skyldes klastogen og/eller aneugen aktivitet.

▼M7

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis dette er kendt

— testkemikaliernes reaktivitet med opløsningsmiddel/bærestof eller celledyrkningsmedium

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som kemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

— den valgte celletype og oprindelse

— den valgte celletypes egnethed

— fravær af mycoplasma for cellelinjer

— for cellelinjer oplysninger om cellecyklussens længde eller proliferationsindeks

— når der anvendes lymfocytter, bloddonorernes køn, alder og andre relevante oplysninger om donoren, fuldblodslymfocytter eller fraseparerede lymfocytter, benyttet mitogen

— cellecyklussens normale længde (negativ kontrol)

— eventuelt antal passager for cellelinjer

— eventuelle metoder til opbevaring af cellekulturer for cellelinjer

— normalt kromosomtal for cellelinjer.

▼**M7**

Testbetingelser:

— det cytokineseblokerende stofs (f.eks. cytoB) betegnelse og koncentration samt varigheden af cellernes eksponering for stoffet

— testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— mediets sammensætning og eventuel CO_2-koncentration, fugtighedsniveau

— koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmidlet og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet

— inkubationstemperatur og -periode

— behandlingens varighed

— høsttidspunkt efter behandling

— celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde for S9, metode til fremstilling af S9-sammensætning, koncentration eller volumen af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9) (f.eks. enzymatisk aktivitet, sterilitet, metabolisk kapacitet)

— positive og negative kontrolkemikalier, endelige koncentrationer, behandlingsbetingelser og -varighed samt restitutionstider

— anvendte metoder til præparering af objektglas og farvningsteknik

— kriterier for scoring af mikrokerneceller (valg af analyserbare celler og identifikation af mikrokerner)

— antal analyserede celler

— metoder til måling af cytotoksicitet

— eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoksicitet og anvendt metode

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

— anvendte statistiske analysemetoder

— metoder som f.eks. anvendelse af anti-kinetokor-antistof eller pan-centromerspecifikke prober til bestemmelse af, om mikrokernerne indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant

— anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

— definition af acceptable celler til analyse

— hvis der ikke anvendes cyto B, antal behandlede celler og antal høstede celler for hver kultur, når der benyttes cellelinjer

▼M7

— den anvendte måling af cytotoksicitet, f.eks. CBPI eller RI ved anvendelse af cytokineseblokeringsmetoden, RICC eller RPD, når cytokineseblokeringsmetoden ikke anvendes, eventuelle andre observationer (f.eks. cellekonfluens, apoptose, nekrose, antal metafaser, forekomst af binukleære celler)

— tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse

— data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt

— fordeling af mono-, bi- og multinukleære celler ved anvendelse af en cytokineseblokeringsmetode

— antal celler med mikrokerner, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur, og bestemmelse af, om de er indsamlet fra binukleære eller mononukleære celler, hvis det er relevant

— koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt

— sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontrolprøver (koncentrationer og opløsningsmidler)

— historisk negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt mængden af data

— statistisk analyse og eventuelle P-værdier.

Diskussion af resultater.

Konklusioner.

LITTERATUR

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

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A. A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, s. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A. A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D. A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

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

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenese* vol. 8/4, s. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Kapitel B.10 i dette bilag: In vitro-test for kromosomaberrationer i celler fra pattedyr.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertinis, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼M7

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M. L., J. B. Phelps, W. P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the
in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC's 25. møde, 16.-17. november 2006, tilgængelig på: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Tilgængelig på: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol. 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res*earch, Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Res*earch, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

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

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A. A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C. M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Lorge, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Corvi, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis,* Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Lovell, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

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

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). »A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems«, in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

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

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgængelig på: http://www.pops.int/

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

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). »CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids«, in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

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

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W. P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to »Report from the *in vitro* micronucleus assay working group«. *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Tilgængelig på anmodning.

▼**M7**

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

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

(77) Sobol Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

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

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

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

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). »*In vitro* micronucleus test«, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

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

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

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneugen: Alle kemikalier eller processer, der ved interaktion med komponenterne i det mitotiske og det meiotiske celledelingscyklusapparat forårsager aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Apoptose: Programmeret celledød karakteriseret ved en række trin, der forårsager opløsning af celler i membranbundne partikler, som herefter elimineres ved fagocytose eller afstødning.

Celleproliferation: Forøgelse af celleantal som følge af mitotisk celledeling.

Centromer: DNA-region af et kromosom, hvor begge kromatider holdes sammen, og hvorpå begge kinetokorer er bundet side om side.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Koncentrationer: De endelige koncentrationer af testkemikaliet i dyrkningsmediet.

Klastogen: Alle kemikalier eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Cytokinese: Celledeling umiddelbart efter mitose, hvorved der dannes to datterceller, som hver indeholder en enkelt kerne.

Proliferationsindeks for cytokineseblokerende stof (CBPI): Andelen af celler efter anden deling i den behandlede population i forhold til den ubehandlede kontrol (se formlen i tillæg 2).

Cytostase: Hæmning af cellevækst (se formlen i tillæg 2)

Cytotoksicitet: For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, der gennemføres i fravær af cytochalasin B, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i proliferationsindekset for cytokineseblokering (CPPI) eller replikationsindekset (RI) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 26 og tillæg 2).

For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, der gennemføres i fravær af cytochalasin B, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i den relative populationsfordobling (RPD) eller den relative forøgelse af celletal (RICC) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 27 og tillæg 2).

Genotoksisk: Generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejringer, genmutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Interfaseceller: Celler, der ikke er i mitosefase.

Kinetokor: Proteinstruktur, der samles ved et kromosoms centromer, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

▼M7

Mikrokerner: Små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens eller meiosens telofase ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Mitose: Deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mitoseindeks (MI): Forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; viser populationens formeringsgrad.

Mutagen: Forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Non-disjunction: Forbundne kromatiders manglende evne til at dele sig og spalte sig korrekt til datterceller under udvikling, hvorved der dannes datterceller med anormale kromosomtal.

p53-status: p53-protein indgår i cellecyklusregulering, apoptose og DNA-reparation. Celler, der mangler funktionelt p53-protein, og som ikke kan standse cellecyklussen eller eliminere beskadigede celler via apoptose eller andre mekanismer (f.eks. induktion af DNA-reparation), som vedrører p53-funktioner som reaktion på DNA-beskadigelse, bør teoretisk set være mere modtagelige for genmutationer eller kromosomaberrationer.

Polyploidi: Numeriske kromosomaberrationer i celler eller organismer, der involverer et eller flere komplette kromosomsæt, men ikke et enkelt kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindeks (PI): Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2).

Relativ forøgelse af celletal (RICC): Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2).

Relativ populationsfordobling (RPD): Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2).

Replikationsindeks (RI): Andel af afsluttede celledelingscyklusser i den behandlede kultur i forhold til den ubehandlede kontrol i eksponerings- og restitutionsfasen (se formlen i tillæg 2).

S9-leverfraktion: Supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: Blanding af S9-leverfraktionen og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Opløsningsmiddelkontrol: Generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Ubehandlet kontrol: Kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

▼M7

Tillæg 2

FORMLER TIL VURDERING AF CYTOTOKSICITET

Hvis cytoB anvendes, baseres evalueringen af cytotoksicitet på **proliferationsindekset for cytokineseblokerende stof (CBPI)** eller **replikationsindekset (RI)** (17) (69). CBPI angiver det gennemsnitlige antal kerner pr. celle og kan anvendes til at beregne celleproliferationen. RI angiver det relative antal cellecyklusser pr. celle i perioden med eksponering for cytoB i behandlede kulturer sammenholdt med kontrolkulturerne og kan anvendes til at beregne cytostase i procent.

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

og

T = kultur til behandling af testkemikalier

C = kontrolkultur

hvor

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{antal mononukl.celler}) + (2 \times \text{antal mononukl.celler}) + (3 \times \text{antal mononukl.celler}))}{(\text{antal celler i alt})}$$

et CBPI på 1 (alle celler er mononukleære) svarer til en cytostase på 100 %.

Cytostase = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{antal binukl.celler}) + (2 \times \text{antal multinukl.celler}))/(\text{antal celler i alt})_T}{((\text{antal binukl.celler}) + (2 \times \text{antal multinukl.celler}))/(\text{antal celler i alt})_C} \times 100$$

T = behandlede kulturer

C = kontrolkulturer

Et RI på 53 % angiver således, at i forhold til antallet af celler, der delte sig til binukleære og multinukleære celler i kontrolkulturen, var der kun 53 % af disse celler, der delte sig i den behandlede kultur, dvs. 47 % cytostase.

Hvis cytoB ikke anvendes, anbefales evaluering af cytotoksicitet baseret på **relativ forøgelse af celletal (RICC)** eller **relativ populationsfordobling (RPD)** (69), da der ved begge metoder tages højde for den andel af cellepopulationen, som har delt sig.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{stigning i antal celler i behandlede kulturer}(\text{slut} - \text{start}))}{(\text{stigning i antal celler i kontrolkulturer}(\text{slut} - \text{start}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{antal populationsfordoblinger i behandlede kulturer})}{(\text{antal populationsfordoblinger i kontrolkulturer})} \times 100$$

hvor:

Populationsfordobling = [log (celleantal efter behandling ÷ oprindeligt celleantal)] ÷ log 2

Et RICC eller RPD på 53 % angiver således 47 % cytotoksicitet/cytostase.

▼**M7**

Ved anvendelse af et **proliferationsindeks (PI)** kan cytotoksiciteten vurderes ved optælling af antallet af kloner med 1 celle (cl1), 2 celler (cl2), 3-4 celler (cl4) og 5-8 celler (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI er også blevet anvendt som en værdifuldt og pålideligt cytotoksicitetsparameter for cellelinjer dyrket in vitro uden cytoB (35) (36) (37) (38) og kan betragtes som en nyttig supplerende parameter.

Under alle omstændigheder bør antallet af celler inden behandling være det samme for behandlede og negative kontrolkulturer.

Selv om RCC (dvs. antal celler i behandlede kulturer/antal celler i kontrolkulturer) tidligere er blevet brugt som cytotoksicitetsparameter, anbefales dette ikke længere, da cytotoksiciteten kan undervurderes.

Ved hjælp automatiserede scoringssystemer, f.eks. flowcytometri, laserskanningcytometri eller billedanalyse, kan antallet af celler i formlen erstattes af antallet af kerner.

I de negative kontrolkulturer bør populationsfordobling eller replikationsindeks være forenelige med kravet om udtagning af celler efter behandling efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange normal cellecyklus.

▼M3

B.50. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: DA**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) (B.42) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429), er blevet revideret (1). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA anvendes radioisotopisk thymidin eller jod til måling af lymfocytproliferation, og assayet har derfor begrænset anvendelse, når fremstilling, anvendelse eller bortskaffelse af radioaktivitet er problematisk. LLNA: DA (udviklet af Daicel Chemical Industries, Ltd.) er en ikkeradioaktiv modificering af LLNA, der kvantificerer adenosintrifosat (ATP)-indholdet ved hjælp af bioluminescens som indikator for lymfocytproliferation. LLNA: DA-testmetoden er blevet valideret og gennemgået og anbefales af et internationalt peer review-panel, der vurderer, at metoden med visse begrænsninger kan anvendes til at udpege hudsensibiliserende og ikkehudsensibiliserende kemikalier (10) (11) (12) (13). TM'en anvendes til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I kapitel B.6 i dette bilag og i OECD Test Guideline 406 anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehler-testen (14). LLNA (kapitel B.42 i dette bilag, OECD Test Guideline 429) og de to ikkeradioaktive modificeringer, LLNA: DA (kapitel B.50 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 A) og LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 B), har alle en fordel frem for marsvine-testene i B.6 og OECD Test Guideline 406 (14) med hensyn til begrænsning og forfinelse af anvendelsen af dyr.

2. I lighed med LLNA består LLNA: DA i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Evnen til at påvise hudsensibiliserende stoffer uden at det er nødvendigt at anvende dna-radioaktivt mærkede stoffer, fjerner risikoen for erhvervsmæssig eksponering for radioaktivitet og imødegår problemer med bortskaffelse af affald. Det kan skabe grundlag for øget anvendelse af mus til påvisning af hudsensibiliserende stoffer, hvilket vil mindske anvendelsen af marsvin til test for potentiale for hudsensibilisering (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (14).

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA: DA er en modificeret LLNA-metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier med bestemte begrænsninger. Det indebærer ikke nødvendigvis, at LLNA: DA altid skal anvendes i stedet for LLNA eller marsvinetest (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (14), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ, for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse (10) (11). Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for

▼M3

strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i betragtning ved vurderingen af, om LLNA: DA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA: DA [se punkt 5]) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA: DA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske antallet af dyr til dette formål i forhold til marsvinetest (B.6, OECD Test Guideline 406) (14). LLNA: repræsenterer desuden en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på, idet LLNA: DA i modsætning til B.6 og OECD Test Guideline 406 ikke kræver, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. På trods af LLNA: DA-metodens fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (14) er der visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige, f.eks. test af visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (6) (1 og kapitel B.42 i dette bilag) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (16), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406 (14). Det anbefales, at de begrænsninger, der er blevet identificeret for LLNA (1 og kapitel B.42 i dette bilag), ligeledes finder anvendelse for LLNA: DA (10). Derudover er det muligvis ikke hensigtsmæssig at anvende LLNA: DA til test af stoffer, der påvirker ATP-niveauet (f.eks. stoffer, der fungerer som ATP-inhibitorer), eller stoffer der påvirker den nøjagtige måling af intracellulær ATP (f.eks. forekomst af ATP-nedbrydende enzymer, forekomst af ekstracellulær ATP i lymfeknuden). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA: DA kunne anvendes til testning af alle stoffer, medmindre disse stoffer har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA: DA-metodens nøjagtighed. Der skal desuden tages hensyn til muligheden for tvetydige positive resultater ved stimulationsindeks (SI)-værdier på mellem 1,8 og 2,5 (se punkt 31-32). Dette er baseret på valideringsdatabasen over 44 stoffer med et SI på 1,8 eller derover (se punkt 6), for hvilke LLNA: DA identificerede alle 32 LLNA-sensibiliserende stoffer korrekt, men identificerede tre ud af 12 LLNA-ikkesensibiliserende stoffer med SI-værdier på mellem 1,8 og 2,5 (dvs. tvetydige positive resultater) forkert (10). Da det samme datasæt blev anvendt til fastsættelse af SI-værdierne og beregning af testens prædiktionsevne, kan de anførte resultater imidlertid være en overvurdering af den reelle prædiktionsevne.

TESTMETODENS PRINCIP

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA: DA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst 1,8, før teststoffet kan vurderes nærmere som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af måling af ATP-indhold ved hjælp af bioluminescens (vides at korrelere med antal levende celler) (17) til måling af øget celleproliferation i de

▼M3

drænende aurikulære lymfeknuder (18) (19). Ved bioluminescensmetoden anvendes luciferaseenzymet til at katalysere dannelsen af lys fra ATP og luciferin på grundlag af følgende reaktion:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + lys$$

Den udsendte lysintensitet er lineært forbundet til ATP-koncentrationen og måles ved hjælp af et luminometer. Luciferin-luciferaseassayet er en følsom metode til kvantificering af ATP, der benyttes til en lang række formål (20).

BESKRIVELSE AF ASSAYET

Valg af dyreart

7. Mus må foretrækkes til denne test. Valideringsundersøgelser for LLNA: DA blev udelukkende udført med CBA/J-stammen, som derfor betragtes som den foretrukne stamme (12) (13). Der anvendes unge voksne hunmus, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i LLNA: DA-respons.

Miljøbetingelser og fodring

8. Mus bør anbringes i grupper (21), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

Forberedelse af dyrene

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

Fremstilling af forsøgsopløsninger

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

▼M3

Pålidelighedskontrol

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed på et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. DA. Det anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA: DA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 1,8 større end i den negative kontrolgruppe. PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 10 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 101-86-0) og 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA: DA (dvs. udfører LLNA: DA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA: DA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en ændring af LLNA: DA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (22).

▼M3

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (23). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type stoffers potentiale for hudsensibilisering. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA: DA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

TESTPROCEDURE

Antal dyr og dosisniveauer

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning (2) og (24). Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (24) (25). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), N,N-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (6), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

▼M3

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 33). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppen, når der indsamles data for de enkelte dyr (22). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Regelmæssig indsamling af data for de enkelte dyr øger dyrevelfærden, idet man undgår gentagelse af forsøg, som ville være nødvendige, hvis tilsynsmyndigheder på et senere tidspunkt stiller andre krav til de teststofresultater, der oprindeligt blev indsamlet på én måde (f.eks. på grundlag af poolede data for dyr), (f.eks. krav om data for de enkelte dyr).

Prescreening

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA: DA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA: DA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA: DA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 8). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (25). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis), på dag 7 (24 timer før afslutning) og på dag 8. På dag 8 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på ≥ 3 og/eller en forøgelse af øretykkelsen på ≥ 25 % på måledagen (26) (27). Den højeste dosis i LLNA: DA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

Tabel 1

Erytemscorer

Observation	Score
Intet erytem	0
Meget let erytem (knapt diagnosticerbart)	1
Veldefineret erytem	2

▼M3

Observation	Score
Moderat til svært erytem	3
Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet	4

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (26) (27) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (30) (31) (32) (33) (34).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (35), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA: DA-hovedundersøgelsen: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 8 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (36).

Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 1 % natriumlaurylsulfat (SLS) i form af en vandig opløsning ved hjælp af en børste dyppet i SLS-opløsningen, således at hele dorsum af hvert øre dækkes med fire til fem strøg. En time efter SLS-behandlingen påføres dorsum af hvert øre 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15)

— *Dag 2, 3 og 7:* Proceduren fra dag 1 for forbehandling med 1 % SLS-vandopløsningen og påføring af teststoffet gentages.

— *Dag 4, 5 og 6:* Ingen behandling.

— *Dag 8:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Ca. 24-30 timer efter påføringen på dag 7 aflives dyrene humant. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og behandles særskilt i en phosphatbufferet saltopløsning (PBS) for hvert dyr. Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (22). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

▼M3

Fremstilling af cellesuspensioner

26. Fra hver mus fremstilles en bilateralt eksciseret enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC) ved at anbringe lymfeknuderne mellem to objektglas og påføre et let tryk for at knuse knuderne. Når det er konstateres, at vævet er blevet spredt ud i et tyndt lag, adskilles de to objektglas. Vævet på begge objektglas opslæmmes i PBS ved at holde hvert objektglas i vinkel over petriskålen og rense det med PBS, samtidigt med at vævet skrabes af objektglasset med en celleskraber. Lymfeknuder i negative kontroldyr er desuden små, så det er vigtigt, at de håndteres forsigtigt for at undgå en kunstig indvirkning på SI-værdier. Der anvendes en samlet volumen på 1 ml PBS til rensning af begge objektglas. LNC-suspensionen i petriskålen homogeniseres let med celleskraberen. Der udtages en 20 µL-prøve af LNC-suspensionen med en mikropipette, idet det sikres, at den synlige membran ikke udtages, og prøven blandes herefter med 1,98 ml PBS til fremstilling af en 2 ml-prøve. Der fremstilles herefter en ny 2 ml-prøve efter samme metode, således at der fremstilles to prøver for hvert dyr.

Bestemmelse af celleproliferationen (måling af ATP-indholdet i lymfocytter)

27. Forøgelser af ATP-indholdet i lymfeknuder måles ved hjælp af luciferin/luciferasemetoden med et ATP-målekit, der måler bioluminescens i relative lysenheder (RLU). Testperioden fra tidspunktet for aflivning af dyret til måling af ATP-indholdet for hvert enkelt dyr skal være ens og ligge inden for ca. 30 minutter, da det vurderes, at ATP-indholdet reduceres gradvist efter aflivning af dyret (12). Procedurerne fra ekscision af aurikulære lymfeknuder til måling af ATP skal således afsluttes inden for 20 minutter på grundlag af en forud fastlagt tidsplan, der gælder for alle dyr. ATP-luminescensen måles i hver 2 ml-prøve, således at der indsamles i alt to ATP-målinger for hvert dyr. Den gennemsnitlige ATP-luminescens måles herefter og anvendes i efterfølgende beregninger (se punkt (30).

OBSERVATIONER

Kliniske observationer

28. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (36).

Kropsvægt

29. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

30. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som den gennemsnitlige SI-værdi. SI-værdien fås ved at dividere den gennemsnitlige RLU/mus i hver stoftestgruppe og PC-gruppen med den gennemsnitlige RLU/mus for opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1.

▼M3

31. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 1,8 (10) Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat (dvs. en SI-værdi på mellem 1,8 og 2,5) anses for at være positivt (2) (3) (37).

32. I tilfælde af tvetydige resultater med en SI på mellem 1,8 og 2,5 vil det være hensigtsmæssigt at tage højde for yderligere oplysninger som f.eks. dosis-responsforholdet, dokumentation for systemisk toksicitet eller for stærk irritation og i påkommende tilfælde statistisk signifikans sammen med SI-værdierne for at få bekræftet, at disse resultater er positive (10). Teststoffets forskellige egenskaber bør ligeledes tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (4).

33. Indsamling af data for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolgrupper). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. Data opstilles i tabelform med angivelse af det enkelte dyrs RLU-værdier, gruppens gennemsnitlige RLU/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppe.

Testrapport

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel

▼**M3**

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— oprindelse, batchnummer og producentens oplysninger om kvalitetssikring/kvalitetskontrol for ATP-kittet

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— tidspunktet for aflivning af dyr og tidspunktet for måling af ATP for hvert dyr

— en tabel med RLU-værdier for de enkelte mus og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for RLU/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe

▼M3

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (38).

Referencestof: Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Falsk negativ: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt.

Falsk positiv: Et stof, som ved en test fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt.

Fare: Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (38).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (38).

Outlier: En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

Kvalitetssikring: En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (38).

Hudsensibilisering: En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

Stimulationsindeks (SI): En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

Teststof (eller testkemikalie): Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M3

B.51. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: BrdU-ELISA**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) (B.42) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429), er blevet revideret (1 og kapitel B.42 i dette bilag). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA anvendes radioisotopisk thymidin eller jod til måling af lymfocytproliferation, og assayet har derfor begrænset anvendelse, når fremstilling, anvendelse eller bortskaffelse af radioaktivitet er problematisk. LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] er en ikke radioaktiv modificering af LLNA-TM, der anvender ikkeradioaktivt mærket 5-brom-2-deoxyuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 59-14-3) i et ELISA-baseret testsystem til måling af lymfocytproliferation. LLNA: BrdU-ELISA er blevet valideret og gennemgået og anbefales af et internationalt uafhængigt peer review-panel, der vurderer, at metoden med visse begrænsninger kan anvendes til at udpege hudsensibiliserende og ikkehudsensibiliserende kemikalier (10) (11) (12). TM'en anvendes til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I kapitel B.6 i dette bilag og i OECD Test Guideline 406 anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehlertesten (13). LLNA (kapitel B.42 i dette bilag, OECD Test Guideline 429) og de to ikkeradioaktive modificeringer, LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 B) og LLNA: DA (kapitel B.50 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 A), har alle en fordel frem for marsvinetestene i B.6 og OECD Test Guideline 406 (13) med hensyn til begrænsning og forfinelse af anvendelsen af dyr.

2. I lighed med LLNA består LLNA: BrdU-ELISA i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Evnen til at påvise hudsensibiliserende stoffer uden at det er nødvendigt at anvende dna-radioaktivt mærkede stoffer, fjerner risikoen for erhvervsmæssig eksponering for radioaktivitet og imødegår problemer med bortskaffelse af affald. Det kan skabe grundlag for øget anvendelse af mus til påvisning af hudsensibiliserende stoffer, hvilket kan mindske anvendelsen af marsvin til test for potentiale for hudsensibilisering (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13).

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA: BrdU-ELISA er en modificeret LLNA-metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier med bestemte begrænsninger. Det indebærer ikke nødvendigvis, at LLNA: BrdU-ELISA altid skal anvendes i stedet for LLNA eller marsvinetest (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ, for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse (10) (11). Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i

▼M3

betragtning ved vurderingen af, om LLNA: BrdU-ELISA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA: BrdU-ELISA [se punkt 5]) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA: BrdU-ELISA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske antallet af dyr til dette formål i forhold til marsvinetest (B.6, OECD Test Guideline 406) (13). LLNA: BrdU-ELISA repræsenterer desuden en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på, idet LLNA: BrdU-ELISA i modsætning til B.6 og OECD Test Guideline 406 ikke kræver, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. Desuden kræver LLNA: BrdU-ELISA ikke anvendelse af et adjuvans, således som det er tilfældet for maksimeringstesten på marsvin (kapitel B.6 i dette bilag, 13). LLNA: BrdU-ELISA mindsker således dyrenes lidelser. På trods af LLNA: BrdU-ELISA-metodens fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (13) er der visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige, f.eks. test af visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (6) (1) og kapitel B.42 i dette bilag) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (15), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406 (13)). Det anbefales, at de begrænsninger, der er blevet identificeret for LLNA (1 og kapitel B.42 i dette bilag), ligeledes finder anvendelse for LLNA: BrdU-ELISA (10). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA: BrdU-ELISA kunne anvendes til testning af alle kemikalier, medmindre disse kemikalier har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA: BrdU-ELISA-metodens nøjagtighed. Der skal desuden tages hensyn til muligheden for tvetydige positive resultater ved stimulationsindeks (SI)-værdier på mellem 1,6 og 1,9 (se punkt 31-32). Dette er baseret på valideringsdatabasen over 43 stoffer med et SI på 1,6 eller derover (se punkt 6), for hvilke LLNA: BrdU-ELISA identificerede alle 32 LLNA-sensibiliserende stoffer korrekt, men identificere tre ud af 11 LLNA-ikkesensibiliserende stoffer med SI-værdier på mellem 1,6 og 1,9 (dvs. tvetydige positive resultater) (10) forkert. Da det samme datasæt blev anvendt til fastsættelse af SI-værdierne og beregning af testens prædiktionsevne, kan de anførte resultater imidlertid være en overvurdering af den reelle prædiktionsevne.

TESTMETODENS PRINCIP

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA: BrdU-ELISA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst 1,6, før teststoffet kan vurderes nærmere som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af måling af BrdU-indholdet til måling af øget celleproliferation i de drænende aurikulære lymfeknuder. BrdU er beslægtet med thymidin og er ligeledes inkorporeret i dna-cellerne under formering. Inkorporeringen af BrdU måles ved hjælp af ELISA, der anvender et BrdU-specifikt antistof, som også mærkes med peroxydase.

▼M3

Når substratet tilsættes, reagerer peroxydasen med substratet og der frembringes et farvet produkt, som kvantificeres ved en bestemt absorbans ved hjælp af en mikrotiterpladeaflæser.

BESKRIVELSE AF ASSAYET

Valg af dyreart

7. Mus må foretrækkes til denne test. Valideringsundersøgelser for LLNA: BrdU-ELISA blev udelukkende udført med CBA/JN-stammen, som derfor betragtes som den foretrukne stamme (10) (12). Der anvendes unge voksne hunmus, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i BrdU-ELISA-respons.

Miljøbetingelser og fodring

8. Mus bør anbringes i grupper (16), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

Forberedelse af dyrene

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

Fremstilling af forsøgsopløsninger

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Pålidelighedskontrol

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed som et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. BrdU-ELISA. Det

▼M3

anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA: BrdU-ELISA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 1,6 større end i den negative kontrolgruppe). PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 14 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (CAS-nr. 101-86-0) og 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA: BrdU-ELISA (dvs. udfører LLNA: BrdU-ELISA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA: BrdU-ELISA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en procedureændring af LLNA: BrdU-ELISA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (17).

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (18). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

▼M3

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type teststoffers potentiale for hudsensibilisering korrekt. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA: BrdU-ELISA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

TESTPROCEDURE

Antal dyr og dosisniveauer

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning 2 og 19. Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (19) (20 og kapitel B.4 i dette bilag). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (6), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

▼M3

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 33). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppe, når der indsamles data for de enkelte dyr (17). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Regelmæssig indsamling af data for de enkelte dyr øger dyrevelfærden, idet man undgår gentagelse af forsøg, som ville være nødvendige, hvis tilsynsmyndigheder på et senere tidspunkt stiller andre krav til de teststofresultater, der oprindeligt blev indsamlet på én måde (f.eks. på grundlag af poolede data for dyr), (f.eks. krav om data for de enkelte dyr).

Prescreening

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA: BrdU-ELISA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 6). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (20 og kapitel B.4 i dette bilag). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis) og på dag 6. På dag 6 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på ≥ 3 og/eller en forøgelse af øretykkelsen på ≥ 25 % på måledagen (21) (22). Den højeste dosis i LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

Tabel 1

Erytemscorer

Observation	Score
Intet erytem	0
Meget let erytem (knapt diagnosticerbart)	1
Veldefineret erytem	2

▼M3

Observation	Score
Moderat til svært erytem	3
Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet	4

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (21) (22) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (25) (26) (27) (28) (29).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (30), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA: BrdU-ELISA: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 6 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (31).

Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15).

— *Dag 2 og 3:* Påføringen fra dag 1 gentages.

— *Dag 4:* Ingen behandling.

— *Dag 5:* En opløsning på 0,5 ml (5 mg/mus) af BrdU (10 mg/ml) injiceres intraperitonealt.

— *Dag 6:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Ca. 24 timer (24 t) efter BrdU-injektionen aflives dyrene humant. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og behandles særskilt i en phosphatbufferet saltopløsning (PBS) for hvert dyr. Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (17). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

▼M3

Fremstilling af cellesuspensioner

26. Fra hver mus fremstilles en bilateralt eksciseret enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC) ved forsigtig mekanisk disaggregering gennem 200 μm trådnet af rustfrit stål eller en anden acceptabel teknik til fremstilling af en enkeltcellesuspension (f.eks. anvendelse af en pistil i plast til engangsbrug til knusning af lymfeknuderne, der herefter ledes gennem en #70 nylonmaske). Proceduren for fremstilling af LNC-suspensionen er meget vigtig i dette assay, og alle operatører skal derfor sætte sig ind i denne procedure på forhånd. Lymfeknuder i negative kontroldyr er desuden små, så det er vigtigt at de håndteres forsigtigt for at undgå en kunstig indvirkning på SI-værdier. LNC-suspensionens målvolumen skal i hvert enkelt tilfælde justeres til en bestemt optimal volumen (ca. 15 ml). Den optimale volumen er baseret på opnåelsen af en gennemsnitlig absorbans for NC-gruppen, der ligger inden for intervallet 0,1- 0,2.

Bestemmelse af celleproliferationen (måling af BrdU-indholdet i dna af lymfocytter)

27. BrdU måles ved hjælp af ELISA med kommercielt kit (f.eks. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Catalogue Number 11 647 229 001). Kort beskrevet tilsættes 100 μl af LNC-suspensionen til hullerne i en fladbundet tredobbelt mikroplade. Efter fiksering og denaturering af LNC tilsættes anti-BrdU-antistof til hvert hul og henstår til reaktion. Anti-BrdU-antistoffet vaskes efterfølgende af, hvorefter substratopløsningen tilsættes og henstår til fremstilling af kromogen. Herefter måles absorbans ved 370 nm med en referencebølgelængde på 492 nm. Testbetingelserne skal altid optimeres (se punkt 26).

OBSERVATIONER

Kliniske observationer

28. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (31).

Kropsvægt

29. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

30. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som den gennemsnitlige SI-værdi. SI-værdien fås ved at dividere det gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/mus i hver stoftestgruppe og PC-gruppen med det gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/mus for opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1.

BrdU-mærkningsindekset defineres som:

$$\text{BrdU-mærkningsindeks} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

Hvor: em = emissionsbølgelængde og ref = referencebølgelængde.

▼**M3**

31. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 1,6 (10). Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat (dvs. en SI-værdi på mellem 1,6 og 1,9) anses for at være positivt (3) (6) (32).

32. I tilfælde af tvetydige resultater med en SI på mellem 1,6 og 1,9 vil det være hensigtsmæssigt at tage højde for yderligere oplysninger som f.eks. dosis-responsforholdet, dokumentation for systemisk toksicitet eller for stærk irritation og i påkommende tilfælde statistisk signifikans sammen med SI-værdierne for at få bekræftet, at disse resultater er positive (10). Teststoffets forskellige egenskaber bør ligeledes tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (4).

33. Indsamling af data om radioaktivitet for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolgrupper). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. Data opstilles i tabelform med angivelse af de enkelte dyrs BrdU-mærkningsindeksværdier, gruppens gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppe.

Testrapport

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel

▼**M3**

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— oprindelse, batchnummer og producentens oplysninger om kvalitetssikring/kvalitetskontrol (antistoffets følsomhed og specificitet og påvisningsgrænsen) for ELISA-kittet

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse).

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— en tabel med mærkningsindekser for de enkelte mus og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for mærkningsindeks/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe

▼M3

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (33).

Referencestof: Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Falsk negativ: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt (33).

Falsk positiv: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt (33).

Fare: Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (33).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (33).

Outlier: En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

Kvalitetssikring: En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (33).

Hudsensibilisering: En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

Stimulationsindeks (SI): En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

Teststof (eller testkemikalie): Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M4

B.52. **AKUT TOKSICITET (INHALATION) — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 436 (2009). Den første TG 403 for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 og er siden blevet revideret (se kapitel B.2 i dette bilag (1)). Efter vedtagelsen af akut toksicitetsklassemetoden (oral) (kapitel B.1.B i dette bilag) (5) vurderede man, at en akut toksicitetsklassemetode (inhalation) (ATC) skulle udvikles (2) (3) (4). En retrospektiv resultatvurdering af ATC-testmetoden for akut toksicitet ved inhalation viste, at metoden med fordel kan anvendes i forbindelse med klassificering og mærkning (6). ATC-testmetoden for inhalation er en trinvis metode, hvor der anvendes faste målkoncentrationer til at rangordne toksiciteten af testkemikaliet. Letalitet er en central effektparameter, men dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser eller er døende, aflives humant for at mindske deres lidelser. Vejledning om parametre for human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (7).

2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document No. 39 (GD 39) (8).

3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg 1 og GD 39 (8).

4. Testmetoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at rangordne og klassificere testkemikaliet i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (9). Hvis der kræves punktestimater af LC_{50}-værdier eller analyser af koncentration-respons, anvendes kapitel B.2 i dette bilag (1) som testmetode. Yderligere vejledning i valg af testmetode findes i GD 39 (8). Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet, herunder eksisterende forsøg, hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer. Koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, på grund af ætsende ([1]) eller stærkt irriterende virkning, bør ikke testes ved hjælp af denne testmetode [se GD 39 (8)].

([1]) Evalueringen af ætsende virkning kan af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr, eksisterende (in vitro-) data, f.eks. kapitel B.40 (10) og B.40.A (11) i dette bilag eller OECD TG 435 (12), pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data.

▼M4

TESTENS PRINCIP

6. Metoden bygger på en trinvis fremgangsmåde, hvor der opnås tilstrækkelig information om teststoffets akutte toksicitet ved inhalation i en eksponeringsperiode på fire timer til, at det kan klassificeres. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. For hver af de fastlagte koncentrationstrin anvendes der tre dyr af hvert køn. Afhængigt af dyrenes dødelighed og/eller døende tilstand kan to trin være nok til at vurdere testkemikaliets akutte toksicitet. Hvis det dokumenteres, at det ene køn er mere modtageligt end det andet, kan testen fortsættes med kun det mest modtagelige køn. Resultatet af det forudgående trin afgør det efterfølgende trin, f.eks.:

a) ingen yderligere testning nødvendig

b) testning af tre dyr pr. køn eller

c) testning af seks dyr af det mest modtagelige køn, dvs. at kun de laveste estimater for toksisk klasse baseres på seks dyr pr. testkoncentrationsgruppe, uanset køn.

7. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humant og betragtes ved fortolkningen af testresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (7).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

8. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

Forberedelse af dyrene

9. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnes også testudstyret i en kort perioden inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

Dyreopdræt og -sundhed

10. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene

▼M4

eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

11. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (8).

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

12. Der anbefales en fast eksponeringsvarighed på fire timer, ekskl. ækvilibreringstid. Der kan være behov for andre varigheder for at opfylde specifikke krav. Dette begrundes dog i forsøgsrapporten [se GD 39 (8)]. Dyr, der eksponeres i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliet som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

13. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

Partikelstørrelsesfordeling

14. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 μm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (8) (13) (14). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroskopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

▼M4

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

15. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliet ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliets sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliet skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable partikler, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

Kontroldyr

16. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

17. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (8) (15). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

18. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

▼M4

Testkemikalie: nominel koncentration

19. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

20. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentrationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.

21. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

22. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør der anvendes fire prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå t_{95}. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (8).

▼M4

23. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for den samlede blanding og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (8).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

24. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (8)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 14).

FREMGANGSMÅDE

Hovedforsøg

25. Der anvendes tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn på hvert trin. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Det koncentrationsniveau, der anvendes som startdosis, vælges blandt de fire fastsatte niveauer, og det indledende koncentrationsniveau skal være det, der med størst sandsynlighed forventes at fremkalde toksicitet i nogle af de doserede dyr. Forsøgsplanerne for gasser, dampe og aerosoler (anført i tillæg 2-4) repræsenterer test med afskæringsværdierne for CLP-kategori 1-4 (9) for gasser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillæg 2), for dampe (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillæg 3) og for aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillæg 4). Kategori 5, som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), vedrører koncentrationer over de pågældende grænsekoncentrationer. For hver startkoncentration gælder den pågældende forsøgsplan. I forsøgsplanen følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr, indtil en kategorisering kan foretages.

26. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Der bør gå 3-4 dage mellem eksponeringerne på hvert koncentrationsniveau for at få den nødvendige tid til at iagttage en eventuel forsinket toksisk virkning. Tidsintervallet kan korrigeres efter behov, f.eks. hvis den opnåede respons er inkonklusiv.

▼M4

Grænsetest

27. En grænsetest bruges, når testkemikaliet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekoncentration. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller blandinger, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikaliets toksicitet, eller når testkemikaliet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres [se GD 39 (8) for yderligere vejledning].

28. Ved hjælp af den sædvanlige fremgangsmåde eksponeres tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn for koncentrationer på henholdsvis 20 000 ppm for gasser, 20 mg/l for dampe og 5 mg/l for støv/tåge (hvis det er muligt). Dette udgør grænsetesten for denne testmetode. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. MMAD på 1-4 μm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (8)]. I henhold til GHS (16) bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden. Test i GHS-kategori 5 (16), som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed, og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

OBSERVATIONER

29. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionsperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant af hensyn til dyrevelfærden. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikaliet. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Humane Endpoints Guidance Document, skal ligeledes tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

▼M4

30. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

Kropsvægt

31. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på ≥ 20 % sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humant ved afslutningen af perioden efter eksponering.

Patologi

32. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

33. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

▼M4

Testrapport

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

— beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant

▼M4

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata:

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for testblandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m^3 osv.); volumenenheder (f.eks. ppm og ppb) kan også rapporteres i parentes

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliets sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliets sammensætning

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed og varighed)

— kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible

▼M4

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— klassificering i CLP-kategori og afskæringsværdi for LC_{50}.

Diskussion og fortolkning af resultater

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (7).

LITTERATUR:

(1) Kapitel B.2 i dette bilag, Akut toksicitet (Inhalation).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W og Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D og Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537-549.

(4) Diener W og Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 1: 129-134.

(5) Kapitel B.1 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetode.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 105. Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

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

(9) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

(10) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).

(11) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

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

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

(16) FN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York og Genève. Findes på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼**M4**

Tillæg 2

Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for gasser (ppm/4h)

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 2a: startkoncentration er 100 ppm

Tillæg 2b: startkoncentration er 500 ppm

Tillæg 2c: startkoncentration er 2 500 ppm

Tillæg 2d: startkoncentration er 20 000 ppm

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

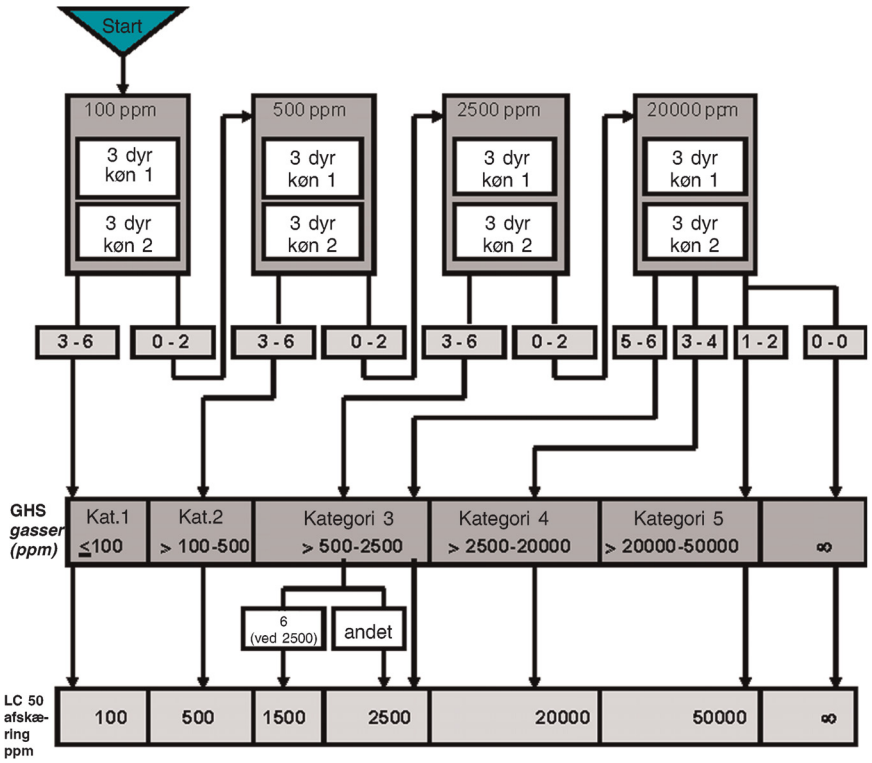
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

Tillæg 2a

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 100 ppm/4 t for gasser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: uklassificeret

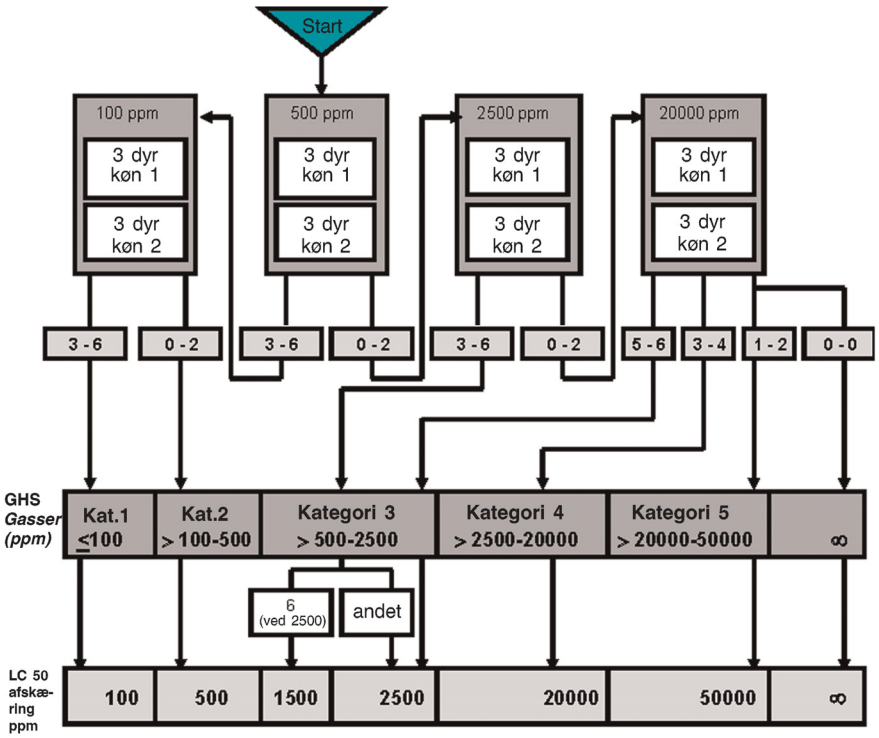
— Testved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 2b

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 500 ppm/4 t for gasser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

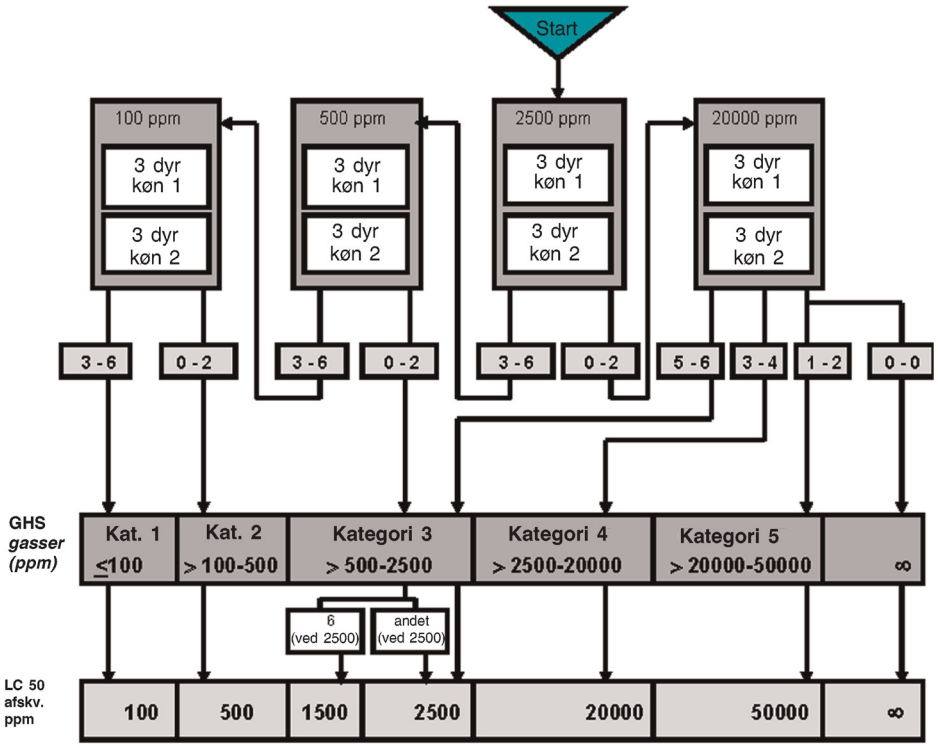
— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 2c

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 500 ppm/4 t for gasser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

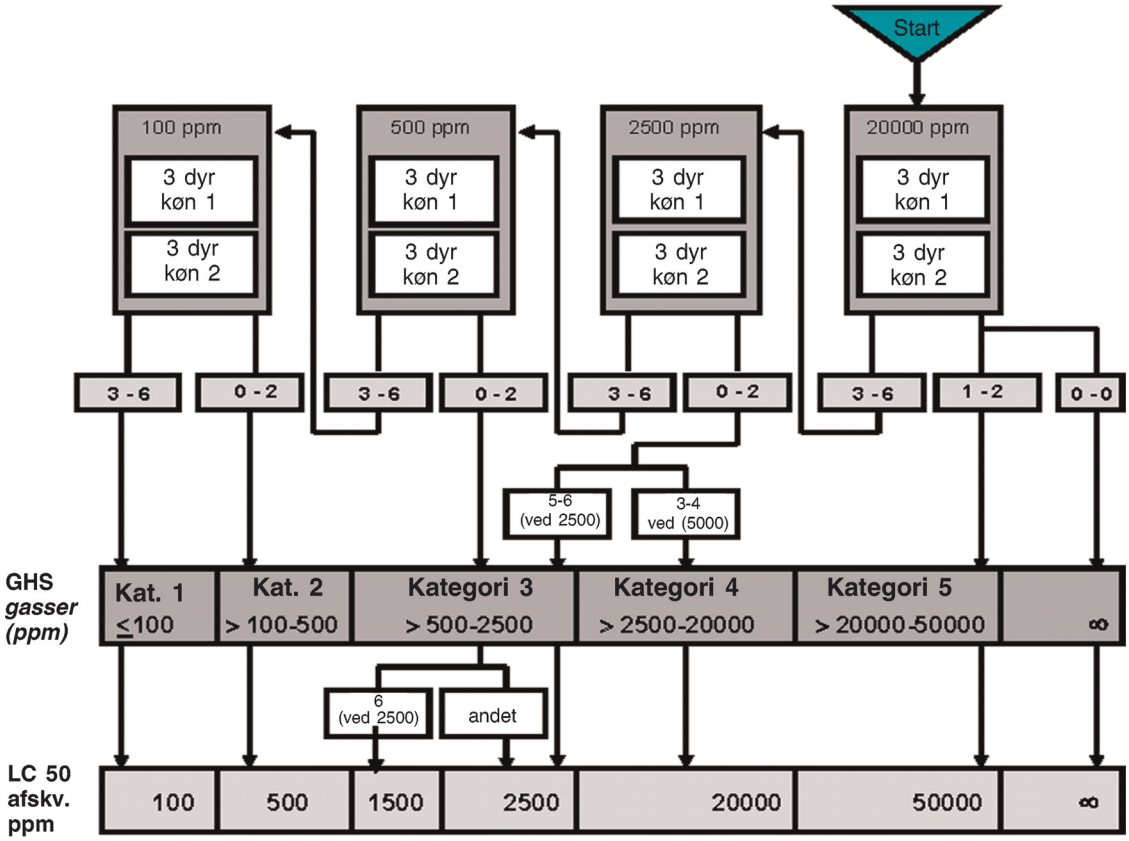
— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 2d

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 000 ppm/4 t for gasser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼**M4**

Tillæg 3

Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for dampe (mg/l/4h)

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 3a: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 3b: startkoncentration er 2,0 mg/l

Tillæg 3c: startkoncentration er 10 mg/l

Tillæg 3d: startkoncentration er 20 mg/l

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

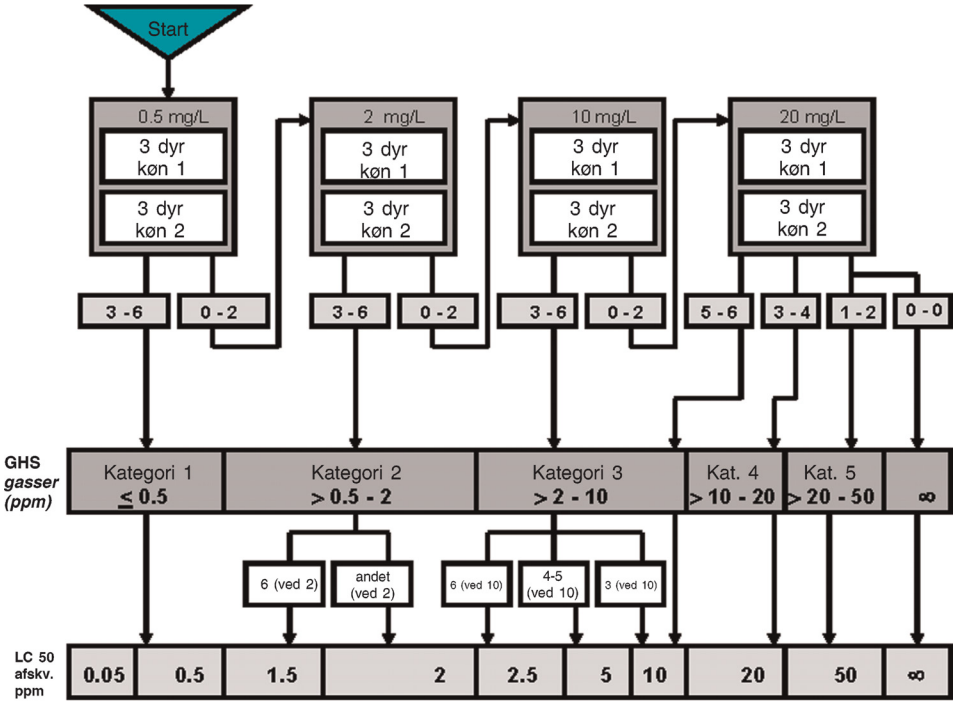
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

Appendix 3a

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

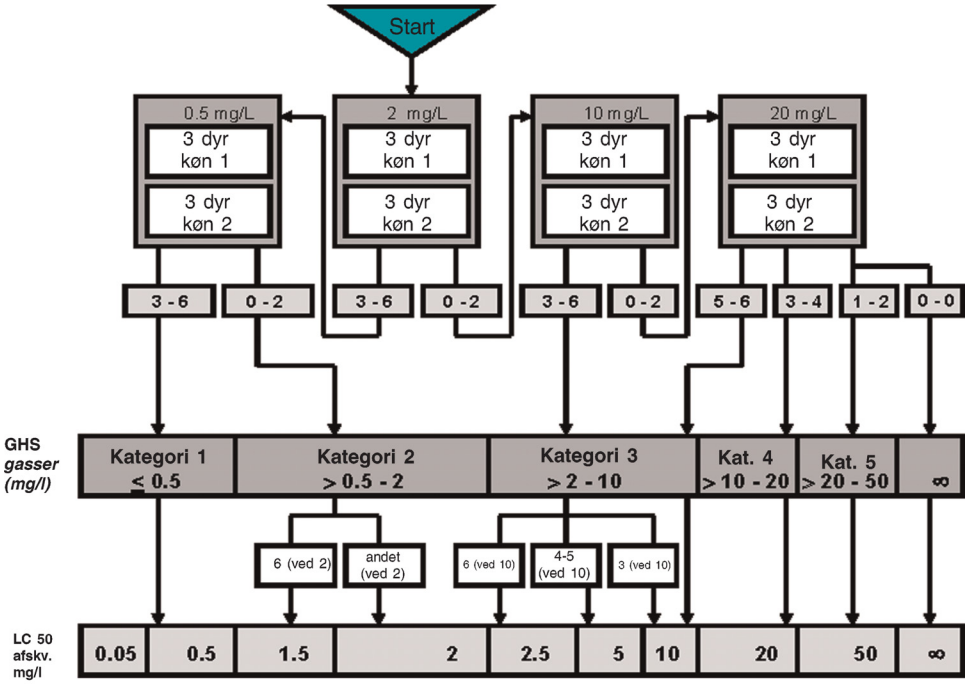
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 3b

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 mg/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

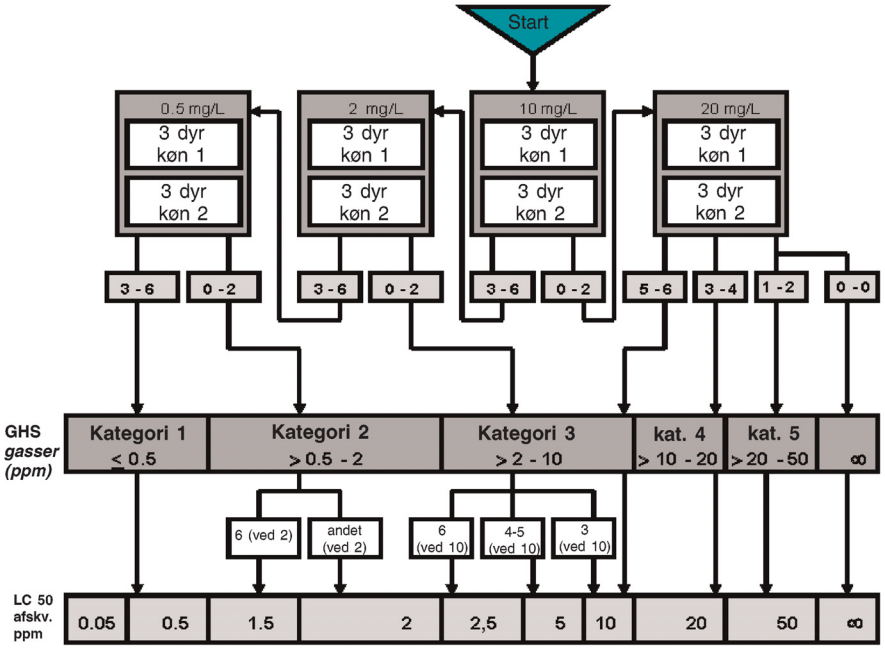
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 3c

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 10 mg/L/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

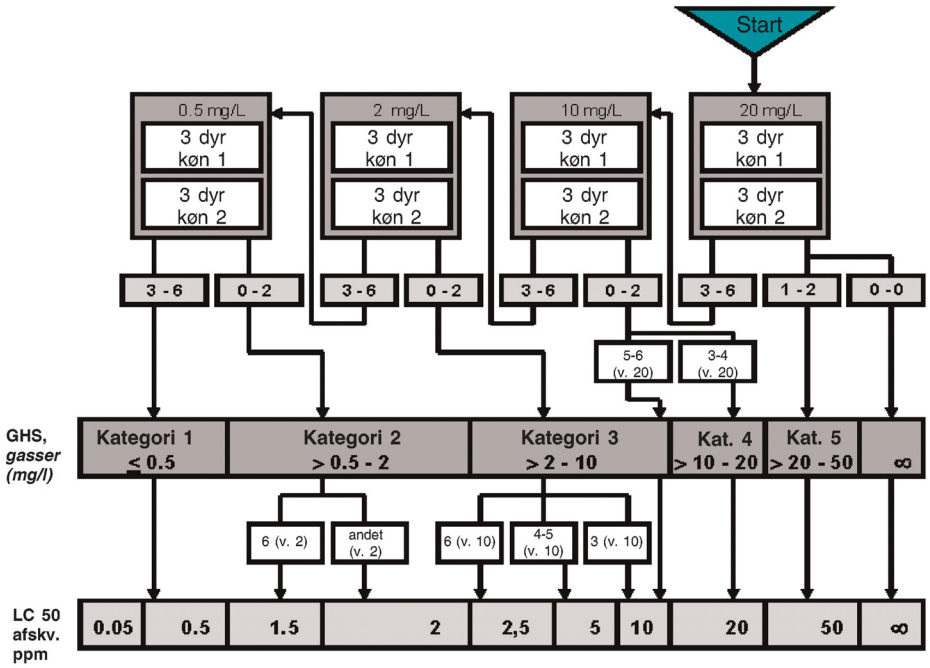
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 3d

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 mg/L/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

— Test ved 50 mg/L/4 t se Guidance Document 39 (8)

▼**M4**

Tillæg 4

Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for aerosoler (mg/l/4h)

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 4a: startkoncentration er 0,05 mg/l

Tillæg 4b: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 4c: startkoncentration er 1 mg/l

Tillæg 4d: startkoncentration er 5 mg/l

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

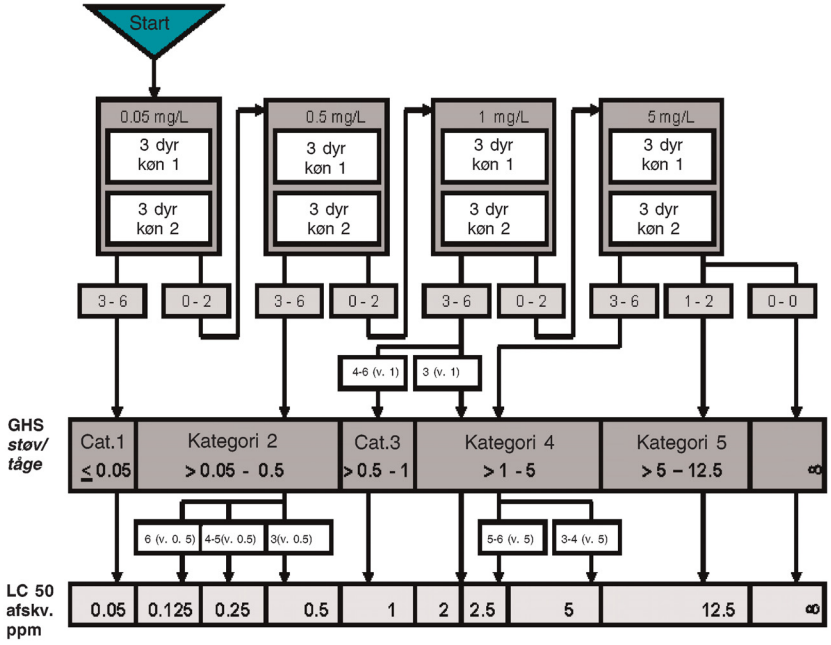
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

Tillæg 4a

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,05 mg/L/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

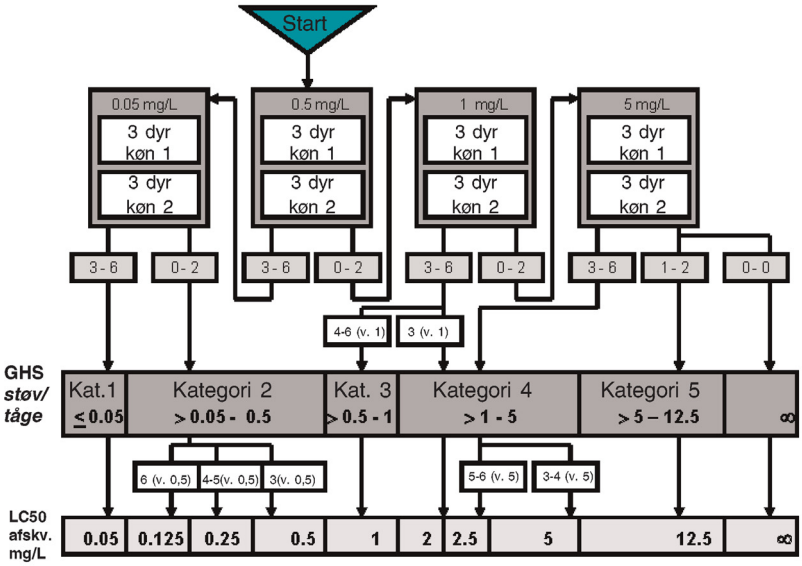
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 4b

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgansmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for aerosoler



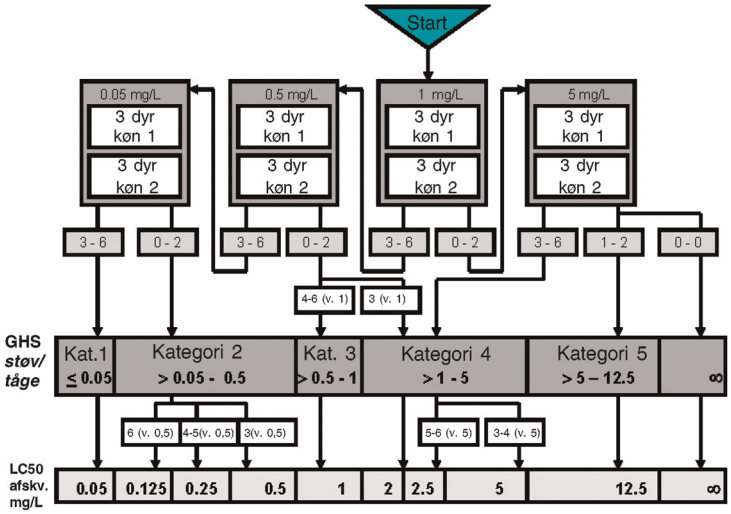
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 4c

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgansmåde med startkoncentration på 1 mg/L/4 t for aerosoler



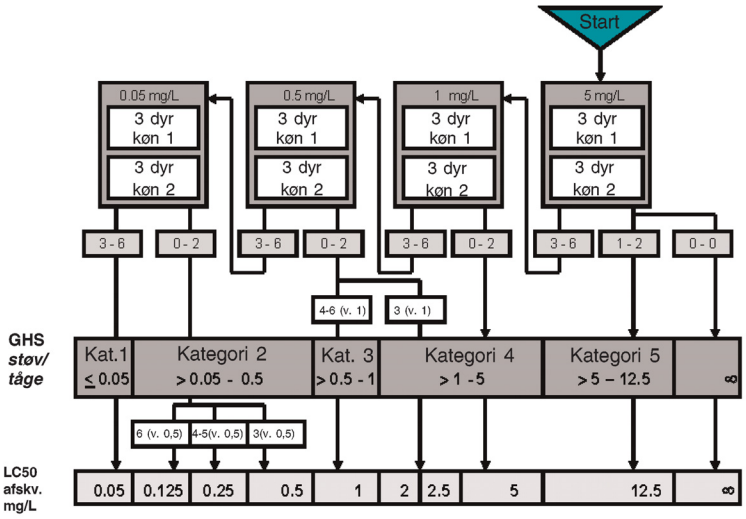
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

Tillæg 4d

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 5 mg/L/4 t for aerosoler



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)«

▼M5

B.53. **UNDERSØGELSE AF NEUROTOKSICITET UNDER UDVIKLINGEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 426 (2007). På et møde i København i juni 1995 drøftede en OECD-arbejdsgruppe om reproduktion og udviklingstoksicitet behovet for at ajourføre den eksisterende OECD-testvejledning for reproduktion og udviklingstoksicitet og for at udforme nye retningslinjer for de endepunkter, som endnu ikke er dækket (1). Arbejdsgruppen anbefalede, at der blev skrevet en testvejledning for udviklingsneurotoksicitet på grundlag af en vejledning fra den amerikanske miljøstyrelse (EPA-vejledning), som siden er blevet revideret (2). I juni 1996 blev der afholdt et andet møde i København for at hjælpe sekretariatet med at skitsere rammerne for en ny testvejledning vedrørende udviklingsneurotoksicitet, bl.a. de vigtigste elementer som f.eks. oplysninger om valg af dyrearter, doseringsperiode, testperiode, endepunkter, der skal vurderes, og kriterier for vurdering af resultater. Der blev udgivet en amerikansk vejledning i vurdering af neurotoksicitetsrisici i 1998 (3). Et OECD-konsultationsmøde med eksperter og en ILSI Risk Science Institute-workshop blev afholdt umiddelbart efter hinanden i oktober 2000, og i 2005 blev der afholdt et konsultationsmøde med eksperter i Tokyo. Disse møder blev holdt for at drøfte de videnskabelige og tekniske spørgsmål vedrørende den nuværende testvejledning, og der blev taget hensyn til anbefalingerne fra møderne (4)(5)(6)(7) i forbindelse med udviklingen af denne testmetode. Supplerende information om, hvilken adfærd, fortolkning og terminologi der skal anvendes til denne testmetode, kan ses i OECD's vejledning nr. 43 om reproduktiv toksicitetsundersøgelse og -vurdering (8) og nr. 20 om neurotoksicitetstest (9).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Det er kendt, at en række kemikalier forårsager en neurotoksisk påvirkning af udviklingen hos mennesker og andre arter (10)(11)(12)(13). En bestemmelse af potentialet for udviklingsneurotoksicitet kan være nødvendig for at vurdere og evaluere et kemikalies toksiske egenskaber. Udviklingsneurotoksicitetsundersøgelser skal resultere i data, bl.a. karakteriseringer af dosis-respons og om de potentielle funktionelle og morfologiske virkninger, der kan opstå på afkommets ikkefærdigudviklede nervesystem ved eksponering in utero og i den første levetid.

3. En udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse kan gennemføres som en særskilt undersøgelse, som en del af en reproduktionstoksicitetsundersøgelse og/eller en neurotoksicitetsundersøgelse af voksne (f.eks. testmetode B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) eller som tillæg til en prænatal udviklingstoksicitetsundersøgelse (f.eks. testmetode B.31 (17)). Når udviklingsneurotoksicitetsundersøgelsen indgår i eller knyttes til en anden undersøgelse, er det afgørende at bevare begge undersøgelsestypers integritet. Alle test skal overholde gældende lovgivning eller statslige og institutionelle retningslinjer for anvendelsen af forsøgsdyr i forskning (f.eks. 18).

4. Testlaboratoriet bør inden testens udførelse gennemgå alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet. Disse oplysninger skal omfatte kemikaliets identitet og struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre in vitro- eller in vivo-toksicitetstest af kemikaliet, toksikologiske data om strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige for til alle parters tilfredshed at godtgøre, at testen har afgørende betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af passende startdosis.

▼M5

PRINCIP FOR TESTEN

5. Testkemikaliet indgives til dyr under drægtighed og laktation. Moderdyr testes for at vurdere virkningerne hos drægtige og diegivende hunner og kan også give komparativ information (moderdyr kontra afkom). Afkom udvælges vilkårligt fra kuld med henblik på en vurdering af neurotoksiciteten. Vurderingen består af observationer for at afsløre større neurologiske og adfærdsmæssige abnormiteter, bl.a. vurdering af fysisk udvikling, adfærdsudvikling, motorisk aktivitet, motoriske og sensoriske funktioner samt indlæring og hukommelse og vurdering af hjernevægt og neuropatologi under postnatal udvikling og voksenliv.

6. Når testmetoden gennemføres som en særskilt undersøgelse, kan der anvendes yderligere tilgængelige dyr i hver gruppe til særlige neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, der kan supplere de data, der fås fra undersøgelser, som anbefales for denne testmetode (16)(19)(20)(21). De supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer, forventede virkninger eller virkningsmekanisme/virkemåde peger på neurotoksicitet af en bestemt art. Disse supplerende procedurer kan anvendes hos både moderdyr og unger. Endvidere kan ex vivo- eller in vitro-procedurer også følges, så længe disse procedurer ikke ændrer in vivo-procedurernes integritet.

FORBEREDELSER TIL TESTEN

Valg af dyreart

7. Den foretrukne dyreart er rotten, men andre arter kan bruges, når det er hensigtsmæssigt. Det skal dog bemærkes, at det antal drægtighedsdage og dage efter fødslen, der er anført i denne testmetode, gælder specifikt for de hyppigst anvendte rottestammer, og der bør vælges sammenlignelige dage, hvis der bruges en anden art eller en usædvanlig stamme. Anvendes der en anden art, skal dette begrundes med toksikologiske, farmakokinetiske og/eller andre data. I begrundelsen anføres, om der findes artsspecifikke postnatale neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske vurderinger. Hvis en tidligere test har givet anledning til bekymringer, bør den art/stamme, som blev anvendt, gennemgås. På grund af forskellige rottestammers forskellige ydeevneegenskaber skal der foreligge dokumentation for, at den valgte stamme har tilstrækkelig fertilitet og modtagelighed. Andre arters pålidelighed og følsomhed i forbindelse med detektion af udviklingsneurotoksicitet dokumenteres.

Miljøbetingelser og fodring

8. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Det er også muligt at vende lyscyklussen forud for parring og i undersøgelsens løbetid for at foretage vurderinger af funktionelle og adfærdsmæssige endepunkter i mørke perioder (under rødt lys), dvs. i den tid dyrene er normalt aktive (22). Alle ændringer i lys-mørkecyklussen bør omfatte tilstrækkelig tid til akklimatisering, så dyrene kan tilpasse sig den nye cyklus. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Arten af foder og vand rapporteres, og begge dele analyseres for forurenende stoffer.

▼M5

9. Dyrene kan anbringes individuelt eller i bure i små grupper af samme køn. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Efter tegn på kopulation eller senest på drægtighedsperiodens dag 15 anbringes parrede hunner hver for sig i fødebure eller yngelbure. Burene skal anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Parrede hunner skal forsynes med egnet og nærmere bestemt redemateriale, når fødselstidspunktet nærmer sig. Det er velkendt, at uhensigtsmæssig behandling eller stress i drægtighedsperioden kan medføre negative resultater, herunder prænatalt tab og forandringer i prænatal og postnatal udvikling. For at sikre mod prænatalt tab som følge af ikkebehandlingsrelaterede faktorer skal drægtige dyr håndteres med omhu, og stress forårsaget af ydre faktorer som støj skal undgås.

Forberedelse af dyrene

10. Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene, og som ikke tidligere har været anvendt til eksperimenter, medmindre undersøgelsen indgår i en anden undersøgelse (se pkt. 3). Dyrene beskrives med hensyn til stamme, kilde, køn, vægt og alder. Hvert dyr tildeles og mærkes med sit eget identifikationsnummer. Dyrene i alle testgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder og skal ligge inden for normalområdet for den art eller stamme, der undersøges. På hvert dosisniveau anvendes unge voksne hundyr, som ikke tidligere har født. Det bør sikres, at søskendedyr ikke parres. Dag 0 i drægtighedsperioden (GD 0) er den dag, hvor der observeres en vaginal prop og/eller sperma. Der bør gives tilstrækkelig tid til akklimatisering (f.eks. 2-3 dage) ved køb af drægtige dyr fra en leverandør. Parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne og fordeles så vidt muligt ligeligt mellem grupperne (f.eks. anbefales en stratificeret vilkårlig procedure for at sikre en jævn fordeling mellem alle grupper f.eks. baseret på kropsvægt). Hunner, som insemineres af samme han, fordeles jævnt mellem grupperne.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

11. I hver test- og kontrolgruppe skal der være et tilstrækkeligt antal drægtige hunner, som kan eksponeres for testkemikaliet, for at sikre, at der produceres et passende antal unger med henblik på vurdering af neurotoksiciteten. I alt 20 kuld anbefales på hvert dosisniveau. Doseringsdesign med gentagne eller forskudte grupper er tilladt, hvis det samlede antal kuld pr. gruppe opnås, og der anvendes passende statistiske modeller til forklaring af gentagelser.

12. På eller før dag 4 efter fødslen (PND 4) (dagen for fødslen er PND 0) skal størrelsen på hvert kuld tilpasses ved at fjerne ekstra unger ved vilkårlig udvælgelse for at få en ensartet kuldstørrelse for alle kuld (23). Kuldstørrelsen bør ikke overstige den gennemsnitlige kuldstørrelse for den anvendte stamme af gnavere (8-12). Kuldet skal så vidt muligt have lige mange han- og hununger. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt, er ikke hensigtsmæssigt. Efter standardiseringen af kuld (aflivning) og før den videre test af funktionelle endepunkter skal de enkelte unger, der skal testes før og efter fravænning, mærkes individuelt efter en egnet human metode til identificering af unger (f.eks. 24).

▼M5

Fordeling af dyr til funktionelle og adfærdsmæssige test, hjernevejning og neuropatologiske vurderinger

13. Testmetoden giver mulighed for forskellige tilgange til fordeling af dyr eksponeret in utero og gennem laktation til funktionelle og adfærdsmæssige test, kønsmodning, bestemmelse af hjernevægt og neuropatologisk vurdering (25). Andre test af neuroadfærdsfunktion (f.eks. social adfærd), neurokemiske eller neuropatologiske undersøgelser kan tilføjes i det enkelte tilfælde, så længe integriteten af de oprindelige nødvendige test ikke skades.

14. Ungerne udvælges fra hver dosisgruppe og fordeles til endepunktsvurderinger på eller efter PND 4. Ungerne bør udvælges, således at begge køn fra hvert kuld i hver dosisgruppe så vidt muligt bliver ligeligt repræsenteret i alle test. Til test af motorisk aktivitet bør det samme par han- og hununger testes i alle aldersklasser før fravænning (se pkt. 35). Til alle andre test kan de samme eller særskilte par han- og hundyr fordeles til forskellige adfærdstest. Det kan være nødvendigt at fordele forskellige unger til kognitive funktionstest for fravænnede i modsætning til testen for voksne for at undgå, at disse målinger påvirkes af virkningerne af alder og forudgående træning (26)(27). Ved fravænning (PND 21) kan unger, der ikke udvælges til test, aflives humant. Evt. ændringer i fordelingerne af unger rapporteres. Den statistiske måleenhed er kuldet (eller moderdyret) og ikke ungen.

15. Der er forskellige måder at fordele unger på til eksperimenter før og efter fravænning, kognitive test, patologiske undersøgelser osv. (se figur 1 vedrørende generelt design og tillæg 1 for eksempler på fordeling). Det anbefalede minimumsantal dyr i hver dosisgruppe for undersøgelser før og efter fravænning er følgende:

Kliniske observationer og kropsvægt	Alle dyr
Detaljerede kliniske observationer	20/køn (1/køn/kuld)
Hjernevægt (efter fiksering) PND 11-22	10/køn (1/kuld)
Hjernevægt (ufikseret) ~ PND 70	10/køn (1/kuld)
Neuropatologi (immersions- eller perfusionsfiksering) PND 11-22	10/køn (1/kuld)
Neuropatologi (perfusionsfiksering) PND ~70	10/køn (1/kuld)
Kønsmodning	20/køn (1/køn/kuld)
Øvrige udviklingsmæssige kendetegn (valgfrit)	Alle dyr
Adfærdsudvikling	20/køn (1/køn/kuld)
Motorisk aktivitet	20/køn (1/køn/kuld)
Motorisk og sensorisk funktion	20/køn (1/køn/kuld)
Indlæring og hukommelse	10/køn ([a]) (1/kuld)

([a]) Afhængigt af de kognitive funktionstests følsomhed bør det overvejes at undersøge et større antal dyr, f.eks. op til én han og én hun pr. kuld (se tillæg 1 vedrørende fordeling af dyr) (OECD's vejledning 43 (8) indeholder yderligere vejledning om prøvestørrelse).

▼M5

Dosering

16. Der anvendes mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol. Dosisstørrelserne vælges med sådanne intervaller, at der opnås en gradueret toksisk effekt. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske eller biologiske egenskaber sætter grænser for doseringen, vælges det højeste doseringsniveau således, at det har en vis toksisk effekt på moderdyret (f.eks. kliniske tegn, vægttab (højst 10 %) og/eller evidens for en dosisbegrænsende toksicitet i et målorgan). Den høje dosis kan begrænses til 1 000 mg/kg/dag kropsvægt med visse undtagelser. F.eks. kan den forventede humane eksponering foranledige, at der benyttes en højere dosis. Alternativt foretages pilotundersøgelser eller foreløbige 'range-finding'-undersøgelser for at bestemme de højeste doser, der skal anvendes for at give en minimal grad af toksicitet hos moderdyret. Hvis testkemikaliet har vist sig at være udviklingstoksisk enten i en standardudviklingstoksicitetsundersøgelse eller i en pilotundersøgelse, bør den højeste dosisstørrelse være den maksimale dosis, der ikke påfører for stærk toksicitet hos afkommet eller in utero- eller neonatal død eller deformationer, der er tilstrækkeligt alvorlige til at udelukke en meningsfuld vurdering af neurotoksiciteten. Den laveste dosering må hverken medføre tegn på maternel toksicitet eller udviklingstoksicitet, herunder neurotoksicitet. Der vælges faldende dosisstørrelse med henblik på at påvise en evt. dosisrelateret respons, og det niveau, som ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL), eller doser nær detektionsgrænsen, således at der kan bestemmes en benchmarkdosis. For at fastlægge den aftagende række dosisstørrelser svarer de optimale intervaller ofte til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe ofte foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisstørrelserne.

17. Doseringen vælges under hensyntagen til alle foreliggende toksicitetsdata samt supplerende oplysninger om metabolisme og toksikokinetik af testkemikalie eller beslægtede stoffer. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre, at den valgte dosering er hensigtsmæssig. Direkte dosering til unger bør overvejes på grundlag af eksponering og farmakokinetiske oplysninger (28)(29). Fordele og ulemper overvejes omhyggeligt, før der foretages direkte doseringsundersøgelser (30).

18. Den sideløbende kontrolgruppe skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til indgift af testkemikaliet. Alle dyr skal normalt have samme mængde af enten testkemikalie eller vehikel på grundlag af kropsvægt. Anvendes et vehikel eller andet tilsætningsstof for at lette doseringen, tages følgende egenskaber i betragtning: indvirkningen på testkemikaliets absorption, distribution, metabolisme og retention af testkemikaliet; evt. indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske egenskaber, samt indvirkningen på dyrenes foder- og vandindtagelse eller ernæringstilstand. Vehiklet må ikke skabe virkninger, der vanskeliggør fortolkningen af undersøgelsen, og det må heller ikke være neuroadfærdsmæssigt toksisk eller påvirke reproduktion eller udvikling. For nye vehikler skal der inkluderes en ubehandlet kontrolgruppe ud over vehikelkontrolgruppen. Dyrene i kontrolgruppen/-grupperne behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen/-grupperne.

▼M5

Indgift af doser

19. Testkemikalie eller vehikel indgives ad den vej, som er mest relevant i forhold til human eksponering, og på grundlag af de foreliggende oplysninger om metabolisme og fordeling i forsøgsdyrene. Indgiftsvejen er normalt oral (f.eks. gennem sonde, i føden eller i drikkevandet), men andre veje (f.eks. gennem huden eller ved inhalation) kan benyttes alt efter kendetegn og forventede eller kendte eksponeringsveje for mennesker (OECD's vejledning 43 (8) indeholder yderligere oplysninger). Den valgte indgiftsvej skal begrundes. Testkemikaliet indgives på omtrent samme tidspunkt hver dag.

20. Dosis til det enkelte dyr baseres normalt på den seneste bestemmelse af dyrets kropsvægt. I den sidste tredjedel af drægtighedsperioden må justering af doseringen dog ske med varsomhed. Konstateres der kraftig toksisk effekt hos de behandlede moderdyr, skal disse aflives på en human måde.

21. Testkemikaliet eller -vehiklet indgives som minimum dagligt til parrede hunner fra implantationstidspunktet (GD 6) og i hele laktationsperioden (PND 21), så ungerne eksponeres for testkemikaliet under den præ- og postnatale neurologiske udvikling. Den alder, hvor doseringen starter, og doseringens varighed og frekvens kan justeres, hvis der er dokumentation for et forsøgsdesign, som er mere relevant i forhold til menneskers eksponering. Doseringsvarigheden justeres til andre arter for at sikre eksponering i alle tidlige perioder af hjerneudviklingen (dvs. svarende til prænatal og tidlig postnatal hjernevækst hos mennesker). Dosering kan begynde fra drægtighedsperiodens begyndelse (GD 0), om end man skal være opmærksom på risikoen for, at testkemikaliet forårsager letal virkning før implantation. Ved at indgive kemikaliet på GD 6 kan denne risiko undgås, men udviklingsstadierne mellem GD 0 og 6 vil så ikke blive behandlet. Køber et laboratorium tidsparrede dyr, er det upraktisk at begynde doseringen på GD 0, og i så fald vil GD 6 være en god begyndelsesdag. Testlaboratoriet fastsætter doseringen efter relevant information om testkemikaliets virkninger, tidligere erfaringer og logistiske hensyn. Dette kan betyde, at doseringen udvides ud over fravænningen. Dosering bør ikke forekomme på dagen for fødslen, hvis dyret ikke er helt færdig med at føde sit afkom. Normalt antages det, at ungernes eksponering sker gennem modermælken. Dog bør direkte dosering af unger overvejes i tilfælde, hvor der ikke er tegn på, at ungerne eksponeres kontinuerligt. Tegn på kontinuerlig eksponering kan hentes fra f.eks. farmakokinetiske oplysninger, toksicitet hos afkommet eller ændringer i biomarkører (28).

OBSERVATIONER

Observationer på moderdyr

22. Alle moderdyr observeres nøje mindst én gang dagligt med hensyn til deres almindelige helbredstilstand, herunder morbiditet og mortalitet

23. I behandlings- og observationsperioder foretages detaljerede kliniske observationer jævnligt (mindst to gange ved dosering i drægtighedsperioden og to gange ved dosering i laktationsperioden), idet der anvendes mindst 10 moderdyr pr. dosisniveau. Dyrene observeres uden for deres eget bur af uddannede teknikere, der ikke kender til dyrenes behandling, og efter standardiserede procedurer for at minimere dyrenes stress og forudindtagethed hos observatøren og maksimere pålideligheden mellem observatører. Hvor det er muligt, anbefales det, at observationerne i en given undersøgelse foretages af den samme tekniker.

▼M5

24. Tilstedeværelsen af observerede tegn registreres. Også størrelsesordenen af de observerede tegn registreres, når det er muligt. De kliniske observationer omfatter, men er ikke begrænset til, ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster og/eller mundrespiration og evt. symptomer vedrørende vandladning eller defækation).

25. Evt. usædvanlig respons med hensyn til kropsstilling, aktivitetsniveau (f.eks. nedsat eller øget udforskning af 'open field') og koordinering af bevægelser registreres ligeledes. Ændringer i gangen (f.eks. vralten, ataksi), kropsstilling (f.eks. pukkelrygget) og reaktion på håndtering samt optræden af kloniske eller toniske bevægelser, kramper eller tremor, stereotypier (f.eks. overdreven pleje af pels, usædvanlige bevægelser med hovedet, gentagne cirkelbevægelser) eller bizar adfærd (bidning eller overdreven slikning, selvmutilering, baglæns gang, vokalisation) eller aggression protokolleres.

26. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder dato og klokkeslæt for indtræden af unormal adfærd samt grad og varighed.

27. Dyrene vejes på doseringstidspunktet mindst én gang om ugen under hele undersøgelsen, på eller tæt på fødselstidspunktet og på PND 21 (fravænning). I forsøg med indgift gennem sonde vejes moderdyr mindst to gange om ugen. Doser justeres på tidspunktet for bestemmelse af hver kropsvægt, som det er hensigtsmæssigt. Fødeindtagelse måles én gang om ugen som minimum under drægtighed og laktation. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen, hvis eksponering sker gennem vandforsyningen.

Observationer af afkom

28. Alt afkom observeres nøje mindst én gang dagligt for tegn på toksicitet samt for morbiditet og mortalitet.

29. I behandlings- og observationsperioder foretages mere detaljerede kliniske observationer af afkommet. Afkommet (mindst én unge/køn/kuld) observeres af uddannede teknikere, der ikke kender til dyrenes behandling, og efter standardiserede procedurer for at minimere forudindtagethed hos observatøren og maksimere pålideligheden mellem observatører. Hvor det er muligt, anbefales det, at observationerne foretages af den samme tekniker. Som minimum overvåges endepunkterne, jf. pkt. 24 og 25, med hensyn til det udviklingstrin, som observeres, hvis det er relevant.

30. Alle tegn på toksicitet hos afkommet registreres, herunder dato og klokkeslæt for indtræden af unormal adfærd samt grad og varighed.

Fysiske og udviklingsmæssige kendetegn

31. Ændringer i udviklingskendetegn før fravænningen (f.eks. åbning af ydre ører og øjne, frembrud af fortand) hænger tæt sammen med kropsvægt (30)(31). Kropsvægt kan være den bedste indikator for fysisk udvikling. Måling af udviklingsmæssige kendetegn anbefales derfor kun, når der på forhånd er tegn på, at disse endepunkter vil give ekstra oplysninger. Tidspunkter for vurdering af disse parametre er anført i tabel 1. Alt efter de forventede virkninger og resultaterne af de indledende målinger kan det være tilrådeligt at tilføje ekstra tidspunkter eller foretage målingerne på andre udviklingstrin.

▼M5

32. Det anbefales at benytte postkoital alder i stedet for postnatal alder ved vurdering af fysisk udvikling (33). Hvis unger testes på fravænningsdagen, anbefales det, at denne test udføres før den faktiske fravænning for at undgå en forvirrende effekt fremkaldt af stress i forbindelse med fravænningen. Endvidere bør test af unger efter fravænning ikke ske i de første to dage efter fravænningen.

Tabel 1

Tidsplan for vurdering af fysiske og udviklingsmæssige kendetegn samt funktionelle/adfærdsmæssige endepunkter ([a])

Aldersperioder / Endepunkter	Før fravænning ([b])	Unge ([b])	Unge voksne ([b])
Fysiske og udviklingsmæssige kendetegn			
Kropsvægt og kliniske observationer	én gang om ugen ([c])	mindst hver anden uge	mindst hver anden uge
Hjernevægt	PND 22 ([d])		ved afslutning
Neuropatologi	PND 22 ([d])		ved afslutning
Kønsmodning	—	hvis det er relevant	—
Øvrige udviklingsmæssige kendetegn ([e])	hvis det er relevant	—	—
Funktionelle/adfærdsmæssige kendetegn			
Adfærdsudvikling	Mindst to målinger		
Motorisk aktivitet (herunder tilvænning)	1-3 gange ([f])	—	én gang
Motorisk og sensorisk funktion	—	én gang	én gang
Indlæring og hukommelse	—	én gang	én gang

([a]) Denne tabel viser, hvor mange gange der som minimum skal foretages målinger. Alt efter de forventede virkninger og resultaterne af de indledende målinger kan det være tilrådeligt at tilføje ekstra tidspunkter (f.eks. ældre dyr) eller foretage målingerne på andre udviklingstrin.
([b]) Det anbefales, at unger ikke testes de første to dage efter fravænningen (se pkt. 32). Anbefalet alder for test af unge er: indlæring og hukommelse = PND 25 ± 2, motorisk og sensorisk funktion = PND 25 ± 2. Anbefalet alder for test af unge voksne er PND 60-70.
([c]) Kropsvægt måles mindst to gange om ugen ved direkte dosering af unger med henblik på justering af doser på et tidspunkt med hurtig forøgelse af kropsvægten.
([d]) Hjernevægt og neuropatologi kan evt. vurderes på et tidligere tidspunkt (f.eks. PND 11) (se pkt. 39).
([e]) Andre udviklingsmæssige kendetegn ud over kropsvægt (f.eks. åbning af øjne) registreres, når det er relevant (se pkt. 31).
([f]) Se pkt. 35.

33. Levende unger tælles og kønsbestemmes, f.eks. ved visuel kontrol eller måling af den anogenitale afstand (34)(35), og hver unge i et kuld vejes individuelt ved fødslen eller snarest efter, mindst én gang om ugen under laktation og herefter mindst én gang hver anden uge. Når kønsmodningen er vurderet, bestemmes dyrets alder og kropsvægt på tidspunktet for åbning af vagina (36) og separation af præputium (37) for mindst én han og en hun pr. kuld.

▼M5

Adfærdsudvikling

34. Udvikling af udvalgte adfærdsformer måles hos mindst én unge/køn/kuld i den relevante aldersperiode, idet de samme unger anvendes på alle testdage til alle vurderede adfærdsformer. Målingsdagene fordeles jævnt over perioden for at definere enten den normale eller behandlingsrelaterede ændring i udviklingen af den pågældende adfærd (38). Følgende er eksempler på adfærdsformer, hvis ontogenese kan vurderes: opretningsrefleks, negativ geotaxis og motorisk aktivitet (38)(39)(40).

Motorisk aktivitet

35. Motorisk aktivitet overvåges (41)(42)(43)(44)(45) inden fravænningen og i den voksne periode. Med hensyn til test på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Testsessionen skal være lang nok til at påvise ubehandlede kontroldyrs tilvænning i løbet af sessionen. Anvendelse af motorisk aktivitet til at vurdere individets adfærdsudvikling anbefales kraftigt. Hvis testen bruges som en test af adfærdsudvikling, anvendes de samme dyr til alle testsessioner før afvænning. Testen skal ske tilstrækkeligt hyppigt til at vurdere udviklingen i tilvænningen i løbet af sessionen (44). Dette kan kræve tre eller flere tidsperioder forud for og inklusive fravænningsdagen (f.eks. PND 13, 17, 21). Test af de samme dyr eller dyr fra samme kuld skal også ske i voksenalderen, tæt på undersøgelsens afslutning (f.eks. PND 60-70). Der kan om nødvendigt foretages test på supplerende dage. Motorisk aktivitet overvåges af et automatisk aktivitetsregistrerende apparat, som skal kunne afsløre både stigninger og fald i aktiviteten (dvs. at referenceaktiviteten som målt af apparatet ikke må være så lav, at fald ikke afsløres, og heller ikke så høj, at aktivitetsstigninger ikke registreres). Hvert apparat testes efter standardprocedurer for så vidt muligt at sikre operationens pålidelighed på tværs af apparater og dage. Så vidt muligt skal behandlingsgrupperne være ligeligt fordelt på tværs af apparaterne. Hvert dyr testes individuelt. Behandlingsgrupper udlignes på tværs af testgange for at undgå sammenblanding af cirkadiske aktivitetsrytmer. Man skal bestræbe sig på at sikre, at variationer i testbetingelserne er minimale og ikke systematisk relateres til behandlingen. Blandt de variabler, der kan påvirke mange adfærdsmålinger, bl.a. motorisk aktivitet, er lydniveau, testburets størrelse og form, temperatur, relativ luftfugtighed, lysforhold, lugte, brug af eget bur eller nyt testbur og forstyrrelser fra omgivelserne.

Motorisk og sensorisk funktion

36. Motorisk og sensorisk funktion undersøges i detaljer mindst én gang for modningsperioden og én gang i den unge voksenperiode (f.eks. PND 60-70). Med hensyn til test på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Der skal foretages tilstrækkeligt mange forsøg til at sikre en passende kvantitativ prøvetagning af sensoriske modaliteter (f.eks. somatosensoriske, vestibulære) og motoriske funktioner (f.eks. styrke, koordination). Nogle få eksempler på test for motorisk og sensorisk funktion er træk/tryk-respons (46), opretningsrefleks (47)(48), auditiv startle tilvænning (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) og evokerede potentialer (55).

▼M5

Indlærings- og hukommelsesforsøg

37. En associativ indlærings- og hukommelsestest gennemføres efter fravænning (f.eks. 25 ± 2 dage) og for unge voksne (PND 60 og derover). Med hensyn til forsøg på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Den samme eller (en) særskilt(e) test kan benyttes på disse to udviklingstrin. Der er mulighed for en vis fleksibilitet i valget af test for indlæring og hukommelse hos fravænnede og voksne rotter. Testen/-ene designes dog således, at de opfylder to kriterier. For det første vurderes indlæringen enten som en ændring på tværs af flere gentagne indlæringstest eller -sessioner eller i test, der omfatter et enkelt forsøg, med henvisning til en betingelse, som sikrer kontrol med ikkeassociative virkninger af træningseksperimentet. For det andet skal testen/-ene omfatte en vis måling af hukommelsen (kort- eller langtids-) ud over oprindelig indlæring (færdighed), men denne hukommelsesmåling kan ikke rapporteres, da der mangler en færdighedsmåling, der fås fra samme test. Hvis indlærings- og hukommelsestesten/-ene viser en virkning af testkemikaliet, kan det overvejes at foretage supplerende test for at udelukke alternative fortolkninger baseret på ændringer i sensorisk, motivationsmæssig og/eller motorisk kapacitet. Ud over ovenstående to kriterier anbefales det, at indlærings- og hukommelsestesten vælges på grundlag af sin påviste følsomhed over for den undersøgte kemikalieklasse, hvis disse oplysninger er tilgængelige i litteraturen. I mangel af sådanne oplysninger omfatter eksempler på test, der kan foretages for at opfylde ovenstående kriterier: passiv undgåelse (43)(56)(57), delayed-matching-to-position for den voksne rotte (58) og for den spæde rotte (59), olfaktorisk konditionering (43)(60), Morris' vandlabyrint (61)(62)(63), Biel- eller Cincinnati-labyrinten (64)(65), radialarmslabyrint (66), T-labyrint (43) og tilegnelse og fastholdelse af 'schedule-controlled' adfærd (26)(67)(68). Supplerende test beskrives i litteraturen for fravænnede (26)(27) og voksne rotter (19)(20).

Obduktion

38. Moderdyr kan aflives efter fravænning af afkommet.

39. Den neuropatologiske vurdering af afkommet sker ved hjælp af væv fra dyr, der er aflivet på en human måde på PND 22 eller på et tidligere tidspunkt mellem PND 11 og PND 22 samt ved testens afslutning. For afkom aflivet efter PND 22 vurderes hjernevæv. For dyr aflivet ved testens afslutning vurderes væv fra både centralnervesystemet (CNS) og det perifere nervesystem (PNS). Dyr aflivet på PND 22 eller tidligere kan fikseres ved enten immersion eller perfusion. Dyr aflivet ved testens afslutning fikseres ved perfusion. I forbindelse med alle aspekter af præpareringen af vævsprøver, fra perfusion af dyrene over dissektion af vævsprøver, vævsbehandling og farvning på objektglas følges et afbalanceret design, således at hver batch indeholder repræsentative prøver fra hver dosisgruppe. OECD's vejledning nr. 20 (9) indeholder supplerende vejledning om neuropatologiske undersøgelser. Se endvidere (103).

Behandling af vævsprøver

40. Alle større abnormiteter, der er synlige på obduktionstidspunktet noteres. Udtagne vævsprøver skal repræsentere alle større dele af nervesystemet. Vævsprøverne præserveres i et egnet fiksativ og behandles ifølge standardiserede offentliggjorte histologiske protokoller (69)(70)(71) (103). Paraffinfiksering er acceptabelt for væv fra CNS og PNS, men osmium ved postfiksering sammen med epoxyfiksering kan være hensigtsmæssigt, når der kræves en højere adskillelsesgrad (f.eks. for perifere nerver ved mistanke om perifer neuropati og/eller til morfometrisk analyse af perifere nerver). Hjernevæv udtaget til morfometrisk analyse fikseres i egnede

▼M5

medier ved alle dosisniveauer samtidig for at undgå skrumpning, der kan optræde i forbindelse med langvarig opbevaring i fiksativ (6).

Neuropatologisk undersøgelse

41. Formålet med den kvalitative undersøgelse er:

i) at identificere områder i nervesystemet, der viser tegn på neuropatologiske forandringer

ii) at identificere typer af neuropatologiske forandringer, der følger af eksponering for testkemikaliet

iii) at bestemme de neuropatologiske forandringers sværhedsgrader.

Repræsentative histologiske snit af vævsprøver undersøges i mikroskop af en uddannet patolog for tegn på neuropatologiske forandringer. Alle neuropatologiske forandringer tildeles en subjektiv sværhedsgrad. En hematoxylin-eosin-farvning kan være tilstrækkelig til at vurdere hjernesnit af dyr, der er aflivet humant på PND 22 eller tidligere. En myelinfarvning (f.eks. luxol fast blue/cresyl violet) og en sølvfarvning (f.eks. Bielschowskys eller Bodians farvestoffer) anbefales til snit af CNS- og PNS-væv fra dyr aflivet ved testens afslutning. Med forbehold for patologens faglige vurdering og typen af observerede forandringer kan andre farver findes egnede til at identificere og karakterisere særlige typer af forandringer (f.eks. gliafibrillært surt protein (GFAP) eller lektin histokemi til at vurdere glia- og mikrogliaforandringer (72), fluoro-jade til at afsløre nekrose (73)(74) eller sølvfarve specifikt til neural degeneration (75)).

42. En morfometrisk (kvantitativ) vurdering udføres, da disse data kan bidrage til at detektere en behandlingsrelateret virkning og er værdifulde i fortolkningen af behandlingsrelaterede forskelle i hjernevægt eller morfologi (76)(77). Nervevæv udtages og præpareres med henblik på morfometrisk vurdering. Morfometriske vurderinger kan omfatte f.eks. lineære målinger eller arealmålinger af særlige hjerneområder (78). Lineære målinger eller arealmålinger kræver brug af homologe snit, der er omhyggeligt udvalgt på grundlag af pålidelige mikroskopiske kendetegn (6). Stereologi kan anvendes til at identificere behandlingsrelaterede virkninger på parametre såsom volumen eller celleantal til bestemte neuroanatomiske områder (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Hjernerne undersøges for evt. tegn på behandlingsrelaterede neuropatologiske forandringer, og der udtages passende prøver fra alle større dele af hjernen (f.eks. bulbus olfactorius, cortex cerebralis, hippocampus, basalganglier, thalamus, hypothalamus, midterhjernen (tectum, tegmentum og pedunculus cerebri), pons, medulla oblongata, cerebellum) for at sikre en grundig undersøgelse. Det er vigtigt, at snit for alle dyr tages i samme plan. Hos voksne, der er humant aflivet ved undersøgelsens afslutning, udtages repræsentative snitprøver af rygmarven og PNS. De undersøgte områder skal omfatte øjet med nervus opticus og retina, rygmarven med intumescentia cervicalis og lumbalis, fibre fra de dorsale og ventrale rødder, den proksimale del af nervus sciaticus, den proksimale del af nervus tibialis (ved knæet) og lægmuskelgrenene af nervus tibialis. Der skal være både tværsnit og længdesnit af rygmarv og perifere nerver.

▼M5

44. Den neuropatologiske evaluering skal omfatte en undersøgelse for tegn på udviklingsskader på nervesystemet (6)(85)(86)(87)(88)(89) ud over celleforandringer (f.eks. neuronal vakuolation, degeneration, nekrose) og vævsforandringer (f.eks. gliosis, leukocytinfiltration, cystedannelse). I den forbindelse er det vigtigt at skelne behandlingsrelaterede virkninger fra normale udviklingshændelser, som man ved, opstår på et udviklingstrin svarende til aflivningstidspunktet (90). Eksempler på væsentlige forandringer, der peger på udviklingsskade, omfatter, men er ikke begrænset til:

— forandringer i den makroskopisk synlige størrelse eller form af bulbus olfactorius, cerebrum eller cerebellum

— forandringer i forskellige hjerneområders relative størrelse, bl.a. fald eller stigninger i områdestørrelse som følge af tab eller persistens af normalt transiente cellepopulationer eller axonale projektioner (f.eks. eksternt germinallag på cerebellum, corpus callosum)

— forandringer i proliferation, migration og differentiation, som viser sig ved områder med stærk apoptose eller nekrose, klynger eller spredte populationer af ektopiske, desorienterede eller misdannede neuroner eller forandringer i forskellige cortikale strukturlags relative størrelse

— forandringer i myeliniseringsmønstre, herunder en samlet størrelsesreduktion eller ændret farvning af myelinerede strukturer

— tegn på hydrocephalus, især udvidelse af ventrikler, stenosis af aqueductus cerebri og tyndere cerebralhemisfærer.

Analyse af neuropatologiske forandringers dosis-responssammenhæng

45. Følgende trinvise procedure anbefales til kvalitative og kvantitative neuropatologiske analyser. Først sammenlignes snit fra højdosisgrupper med snit fra kontrolgruppen. Hvis der ikke findes tegn på neuropatologiske forandringer i dyrene fra højdosisgruppen, kræves der ingen yderligere analyse. Findes der tegn på neuropatologiske forandringer i højdosisgruppen, undersøges dyr fra mellem- og lavdosisgrupperne. Hvis højdosisgruppen afsluttes på grund af død eller anden konfunderet toksicitet, analyseres høj- og mellemdosisgrupperne for neuropatologiske forandringer. Er der tegn på neurotoksicitet i lavere dosisgrupper, udføres en neuropatologisk analyse i de pågældende grupper. Såfremt der findes behandlingsrelaterede neuropatologiske forandringer ved den kvalitative og kvantitative undersøgelse, bestemmes dosisafhængigheden for forekomst, frekvens og læsionernes eller de morfometriske forandringers sværhedsgrad på grundlag af en vurdering af alle dyr fra alle dosisgrupper. Alle hjerneområder, der udviser tegn på neuropatologisk forandring medtages i denne vurdering. For hver læsionstype beskrives de kendetegn, som anvendes til at definere hver sværhedsgrad, med angivelse af de symptomer, der er benyttet til at differentiere hver grad. Frekvensen af hver læsionstype og sværhedsgraden heraf registreres, og der udføres en statistisk analyse for at evaluere arten af en dosis-responssammenhæng. Det anbefales at anvende kodede objektglas (91).

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Data rapporteres individuelt og opsummeres i tabelform, der for hver testgruppe viser typer af forandringer og antal moderdyr, afkom efter køn samt kuld og med angivelse af hver type forandring. Er der foretaget direkte postnatal eksponering af afkom, rapporteres eksponeringsvej, -varighed og -periode.

▼M5

Evaluering og fortolkning af resultater

47. En udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse skal indeholde oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et kemikalie i in utero- og den tidlige postnatale udvikling. Da vægten ligger på endepunkter for både generel toksicitet og udviklingsneurotoksicitet, vil resultaterne af undersøgelsen gøre det muligt at skelne mellem neuroudviklingsmæssige virkninger, som opstår uden generel maternel toksicitet, og dem, der kun kommer til udtryk på niveauer, som også er toksiske for moderdyret. På grund af det komplekse samspil mellem undersøgelsesdesign, statistisk analyse og dataenes biologiske signifikans, kræver en adækvat fortolkning af udviklingsneurotoksicitetsdata en ekspertvurdering (107)(109). Ved fortolkning af testresultater følges en 'weight-of-evidence'-tilgang (20)(92)(93)(94). Evt. mønstre i adfærdsmæssige eller morfologiske resultater samt tegn på dosis-respons diskuteres. Data fra alle undersøgelser af relevans for evalueringen af udviklingsneurotoksicitet, bl.a. humanepidemiologiske undersøgelser eller caserapporter og eksperimentelle dyreunderstudier (f.eks. toksikokinetiske data, oplysninger om struktur/aktivitet, data fra andre toksicitetsundersøgelser) medtages i denne karakterisering. Dette omfatter forholdet mellem doser af testkemikaliet og tilstedeværelse eller mangel, incidens og omfang af en evt. neurotoksisk virkning for hvert køn (20)(95).

48. Evalueringen af data skal indeholde en diskussion af både biologisk og statistisk signifikans. Statistisk analyse skal ses som et værktøj, der guider snarere end bestemmer fortolkningen af data. Manglende statistisk signifikans må ikke være det eneste rationale for at konkludere, at der mangler en behandlingsrelateret virkning, ligesom statistisk signifikans ikke må være den eneste begrundelse for at konkludere, at der foreligger en behandlingsrelateret virkning. For at sikre mod mulige falsk negative fund og de iboende vanskeligheder med at »bevise et negativt fund« skal tilgængelige positive og tidligere kontroldata diskuteres, især når der ikke er nogen behandlingsrelaterede virkninger (102)(106). Sandsynligheden for falsk positive fund diskuteres i lyset af den samlede statistiske evaluering af dataene (96). Evalueringen skal indeholde en evt. sammenhæng mellem observerede neuropatologiske og adfærdsmæssige forandringer.

49. Alle resultater analyseres ved hjælp af statistiske modeller, som egner sig til testens design (108). Valget af en parametrisk eller ikkeparametrisk analyse begrundes ved inddragelse af faktorer såsom dataenes art (transformerede eller ej) og fordelingen heraf samt den valgte statistiske analyses relative robusthed. Undersøgelsens formål og design skal være styrende for valget af statistiske analyser for at minimere type I-fejl (falsk positive) og type II-fejl (falsk negative) (96)(97)(104)(105). Udviklingsundersøgelser med arter, som føder flere unger på én gang, og hvor der testes mange unger pr. kuld, skal inkludere kuldet i den statistiske model for at sikre mod en oppustet type I-fejlhyppighed (98)(99)(100)(101). Den statistiske måleenhed er kuldet og ikke ungen. Forsøgene designes, så dyr fra samme kuld ikke behandles som uafhængige observationer. Et evt. endepunkt, som gentagne gange måles hos det samme individ, analyseres under anvendelse af statistiske modeller, der tager højde for, at målingerne ikke er uafhængige.

Testrapport

50. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikaliet

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata, herunder kilde

▼M5

— præparatets renhed og kendte og/eller forventede urenheder

Evt. vehikel

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand eller fysiologisk saltvand.

Forsøgsdyr

— den anvendte art og stamme samt begrundelse for anvendelse af andet end rotter

— leverandør af forsøgsdyr

— antal dyr samt deres køn og alder ved testens begyndelse

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, vand osv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse.

Testbetingelser

— rationale for valg af dosisniveau

— rationale for doseringsvej og tidsperiode

— specifikationer af indgivne doser, herunder oplysninger om vehikel og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

— anvendt metode til entydig identifikation af moderdyr og afkom

— en detaljeret beskrivelse af de(n) randomiseringsprocedure(r), der er fulgt ved fordeling af moderdyr på behandlingsgrupper, udvælgelse af unger til aflivning og fordeling af unger til testgrupper

— oplysninger om indgift af testkemikaliet

— evt. omregning fra testkemikaliekoncentration (ppm) i foder/drikkevand eller inhalation til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/dag)

— miljøbetingelser

— oplysninger om kvaliteten af foder og vand (f.eks. fra vandhanen, destilleret)

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning.

Observationer og testprocedurer

— en detaljeret beskrivelse af procedurer anvendt til at standardisere observationer og procedurer samt operationelle definitioner for bedømmelse af observationer

— en liste over alle anvendte testprocedurer og begrundelse for anvendelsen heraf

— oplysninger om de anvendte adfærdsmæssige/funktionelle, patologiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, herunder oplysninger og detaljer om automatiserede anordninger

— procedurer til kalibrering og sikring af anordningernes ækvivalens og afbalancering af behandlingsgrupper i testprocedurer

— en kort begrundelse for evt. beslutninger baseret på faglig vurdering.

▼M5

Resultater (individuelle og resumé, herunder middeltal og varians, når det er relevant)

— antal dyr ved undersøgelsens begyndelse og antal ved undersøgelsens afslutning

— antal dyr og kuld anvendt til hver testmetode

— identifikationsnummer for hvert dyr og hvert kuld, det kom fra

— kuldstørrelse og gennemsnitsvægt ved fødslen fordelt på køn

— data om kropsvægt og kropsvægtændringer, herunder slutvægt, for moderdyr og afkom

— evt. data om føde- og vandindtagelse (f.eks. hvis testkemikaliet indgives i vand)

— data for toksiske reaktioner efter køn og dosisniveau, herunder tegn på toksicitet eller mortalitet, bl.a. evt. tidspunkt og dødsårsag

— de detaljerede kliniske observationers art, grad, varighed, startdato og klokkeslæt samt efterfølgende forløb

— scoreværdi for hvert udviklingskendetegn (vægt, kønsmodning og adfærdsudvikling) på hvert observationstidspunkt

— en detaljeret beskrivelse af alle adfærdsmæssige, funktionelle, neuropatologiske, neurokemiske og elektrofysiologiske fund efter køn, herunder både stigninger og fald i forhold til kontrolgrupper

— obduktionsfund

— hjernevægt

— evt. diagnoser udledt af neurologiske tegn og læsioner, herunder naturligt forekommende sygdomme eller tilstande

— billeder af eksemplariske fund

— 'low-power'-billeder til at vurdere homologien af snit anvendt til morfometri

— data om absorption and metabolisme, herunder evt. supplerende data fra en separat toksikokinetisk undersøgelse

— statistisk behandling af resultater, herunder statistiske modeller anvendt til analyse af data og resultater, uanset om de var signifikante eller ej

— liste over forsøgsmedarbejdere, bl.a. uddannelse.

Diskussion af resultater

— oplysninger om dosisrespons fordelt på køn og gruppe

— evt. andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende testkemikaliets neurotoksiske potentiale fordelt på køn og gruppe

— evt. toksikokinetiske oplysningers indvirkninger på konklusionerne

— virkningernes ligheder med kendte neurotoksiske stoffer

▼M5

— data, der støtter testmetodens pålidelighed og følsomhed (dvs. positive og tidligere kontroldata)

— evt. sammenhæng mellem neuropatologiske og funktionelle virkninger

— NOAEL eller benchmarkdosis for moderdyr og afkom fordelt på køn og gruppe.

Konklusioner

— en diskussion af den samlede fortolkning af data baseret på resultater, herunder en konklusion om, hvorvidt testkemikaliet forårsagede udviklingsneurotoksicitet og NOAEL.

LITTERATUR

1) OECD (1995). Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. København, Danmark, 13.-14. juni 1995.

2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Tilgængelig på: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Tilgængelig på: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., USA, 23.-25. oktober 2000.

8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris, juli 2008. Tilgængelig på: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, september 2003. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990). Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000). Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998). Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14) Kapitel B.34 i dette bilag, Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation.

15) Kapitel B.35 i dette bilag, Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer.

16) Kapitel B.43 i dette bilag, Neurotoksicitetsundersøgelse i gnavere.

17) Kapitel B.31 i dette bilag, Prænatal udviklingstoksicitetsundersøgelse.

18) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33.

19) WHO (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Tilgængelig på: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20) WHO (2001). Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Genève. Tilgængelig på: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995). Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997). Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997). The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977). Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989). Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979). Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987). Perinatal Development: A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando.

28) Zoetis, T., Walls, I. (2003). Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005). Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999). Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

31) ICH (1993). ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

32) Lochry, E.A. (1987). Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼M5

33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998). Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999). Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985). Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

38) Spear, L.P. (1990). Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

40) Adams, J. (1986). Methods in Behavioral Teratology. In: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, s. 67-100.

41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979). Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

42) Robbins, T.W. (1977). A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37-82.

43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993). Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985). Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997). Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998). A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661-669.

48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977). A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

49) Davis, M. (1984). The mammalian startle response. In: Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287-351

50) Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

51) Crofton, K.M. (1992). Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicology, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181-211.

▼**M5**

52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989). Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994). Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25-30.

54) Ison, J.R. (1984). Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437-445.

55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992). Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicity, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125-145.

56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990). Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

57) Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

58) Bushnell, P.J. (1988). Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989). Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984). Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

61) Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

64) Vorhees, C.V. (1987). Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

65) Vorhees, C.V. (1997). Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988). Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983). Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981). Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000). Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994). Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84-107.

71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002). Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996). Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001). Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994). Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Vralten-Besrenden, I.D.H., Ligander, M.M., Gundersen, H.J. (2005a). Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Vralten-Besrenden, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b). 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979). Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129-135.

79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York.

80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998). Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993). Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

82) Schmitz, C. (1997). Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

83) West, M.J. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813-831.

85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994). Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995). Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

87) Jensen KF, Catalano SM. (1998). Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3-41.

88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼**M5**

89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000). Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056-1060.

90) Friede, R. L. (1989). Developmental Neuropathology. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992). Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996). Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

93) US EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

94) US EPA (1996). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

95) Miljøstyrelsen (1995). Neurotoxicology. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

97) Gad, S.C. (1989). Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 08:21-27.

98) Abby, H., Howard, E. (1973). Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975). Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992). Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985). Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004). A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006). A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992). The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985). Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008). Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):266-287.

107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008). Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):288-325.

▼**M5**

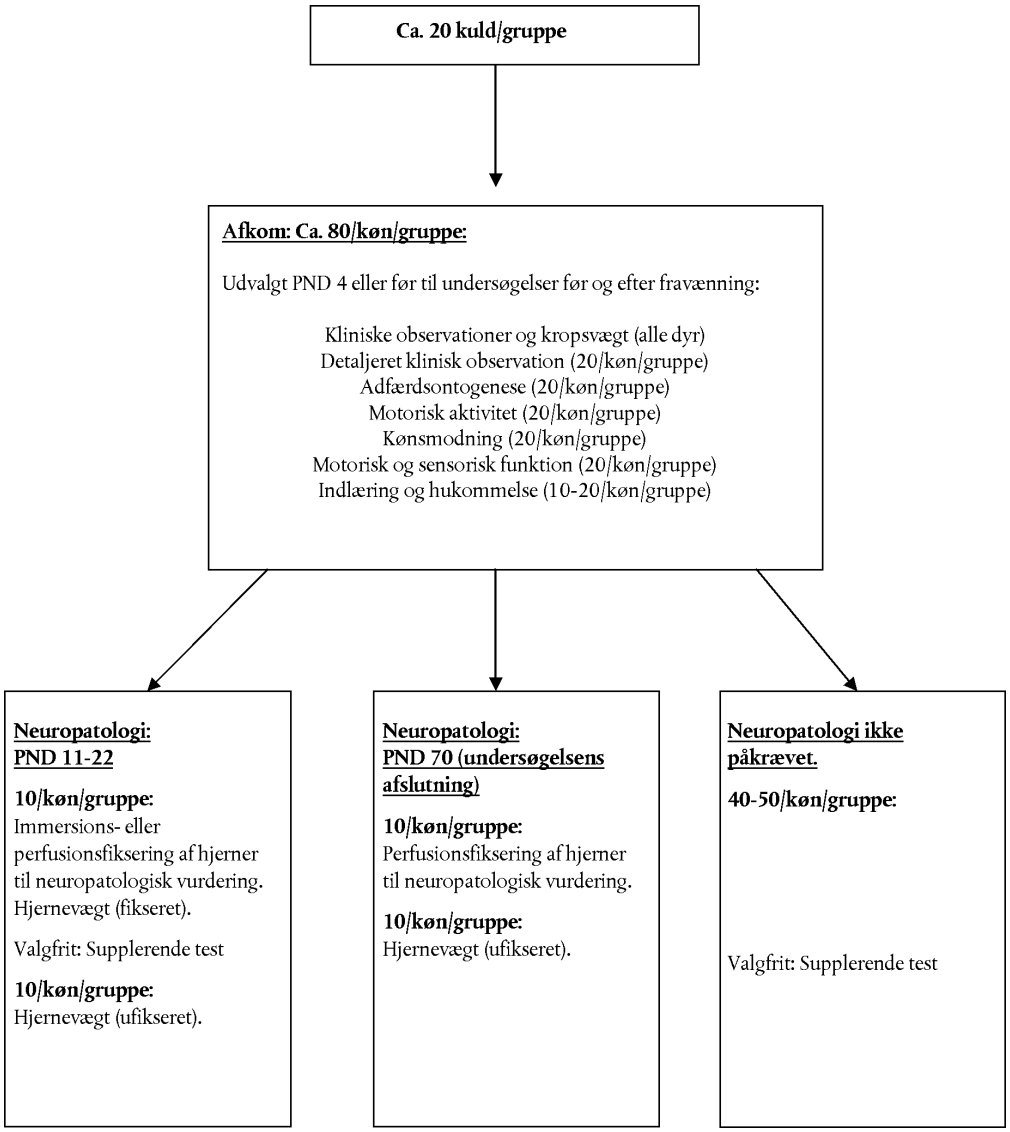
108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008). Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):326-348.

109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008). Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints Neurotoxicology and Teratology, 30(4):349-381.

▼M5

Figur 1

Generel forsøgsplan for funktionelle/adfærdsmæssige test, neuropatologisk evaluering og hjernevægt. Dette diagram er baseret på beskrivelsen i pkt. 13-15 (PND = postnatal day, dag 0 efter fødslen). Eksempler på fordeling af dyr er anført i tillæg 1.



▼**M5**

Tillæg 1

1. Eksempler på mulige fordelinger er beskrevet og opstillet i tabelform nedenfor. Disse eksempler er anført for at illustrere, at fordelingen af forsøgsdyr til forskellige forsøgsparadigmer kan foretages på flere forskellige måder.

Eksempel 1

2. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til test vedrørende adfærdsudvikling før fravænning. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 22. Hjernerne fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse. Endvidere indsamles data om hjernevægt under anvendelse af ufikserede hjerner fra de resterende 10 hanner og 10 hunner pr. dosisniveau.

3. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til funktionelle/adfærdsmæssige test efter fravænning (detaljerede kliniske observationer, motorisk aktivitet, auditiv startle og kognitive funktionsforsøg hos unge voksne) og vurdering af alder ved kønsmodning. Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

4. Til kognitive funktionstest med unge voksne (f.eks. PND 60-70) anvendes en tredje gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld). Af disse dyr aflives 10 dyr/køn/gruppe (én han eller én hun pr. kuld) ved undersøgelsens afslutning, og hjernen fjernes og vejes.

5. De resterende 20 dyr/køn/gruppe udtages til evt. supplerende test.

Tabel 1

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Adfærdsudvikling
		10 m + 10 f	PND 22 hjernevægt/neuropatologi/morfometri
		10 m + 10 f	PND 22 hjernevægt
2	6	20 m + 20 f	Detaljerede kliniske observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Kønsmodning
		20 m + 20 f	Motorisk og sensorisk funktion
		20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (PND 25)
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt/ neuropatologi/morfometri ~ PND 70

▼**M5**

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (unge voksne)
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt ~ PND 70
4	8	—	Reservedyr til udskiftninger eller supplerende test

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.

Eksempel 2

6. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til test vedrørende adfærdsudvikling før fravænning. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 11. Hjernerne fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse.

7. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (én han og én hun pr. kuld) bruges til undersøgelser efter fravænning (detaljerede kliniske observationer, motorisk aktivitet, vurdering af alder ved kønsmodning samt motorisk og sensorisk funktion). Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen, vejes og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

8. Til kognitive funktionstest med unge og unge voksne anvendes 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld). Der anvendes forskellige dyr til forsøg med kognitive funktionstest på PND 23 og unge voksne. Ved afslutningen aflives de 10 dyr/køn/gruppe, der er testet som voksne, hjernen fjernes og vejes.

9. De resterende 20 dyr/køn/gruppe, der ikke er udvalgt til forsøg, aflives og kasseres ved fravænning.

Tabel 2.

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Adfærdsontogenese
		10 m + 10 f	PND 11 hjernevægt/neuropatologi/morfometri
2	6	20 m + 20 f	Detaljerede kliniske observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Kønsmodning
		20 m + 20 f	Motorisk og sensorisk funktion
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70

▼**M5**

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
3	7	10 m + 10 f [b]	Indlæring og hukommelse (PND 23)
3	7	10 m + 10 f [b]	Indlæring og hukommelse (unge voksne) Ung voksen hjernevægt
4	8	—	Dyr aflives og kasseres PND 21.

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.

[b] Forskellige unger bruges til kognitive test på PND 23 og unge voksne (f.eks. lige/ulige kuld fra i alt 20).

Eksempel 3

10. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til hjernevejning og neuropatologisk undersøgelse på PND 11. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 11, og hjerner fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse. Endvidere indsamles data om hjernevægt under anvendelse af ufikserede hjerner fra de resterende 10 hanner og 10 hunner pr. dosisniveau.

11. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til adfærdsontogenese (motorisk aktivitet) undersøgelser efter fravænning (motorisk aktivitet og vurdering af alder ved kønsmodning) samt kognitive funktionstest med unge

12. Endnu en gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til motoriske og sensoriske funktionstest (auditiv startle) og detaljerede kliniske observationer. Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen, vejes og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

13. En anden gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau anvendes til kognitive funktionstest med unge voksne (dvs. én han og én hun pr. kuld). Af disse dyr aflives 10 dyr/køn/gruppe (dvs. én han eller én hun pr. kuld) ved undersøgelsens afslutning, og hjernen fjernes og vejes.

Tabel 3

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	10 m + 10 f	PND 11 hjernevægt/neuropatologi/morfometri
		10 m + 10 f	PND 11 hjernevægt
2	6	20 m + 20 f	Adfærdsontogenese (motorisk aktivitet)
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Kønsmodning
		20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (PND 27)

▼**M5**

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Auditiv startle (unge og unge voksne)
		20 m + 20 f	Detaljerede kliniske observationer
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (unge voksne)
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.

▼**M5**

Tillæg 2

Definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M5

B.54. UTERUSTESTEN I GNAVERE: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR ØSTROGENECITET

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 440 (2007). OECD indledte en højt prioriteret aktivitet i 1998 med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer (1). Ét element i denne aktivitet var at udvikle en testvejledning for det uterotrofiske bioassay med gnavere. Det uterotrofiske bioassay med gnavere blev herefter underkastet et omfattende valideringsprogram, herunder udarbejdelse af et detaljeret background document (2)(3) og gennemførelse af omfattende intra- og interlaboratorieundersøgelser for at vise bioassayets relevans og reproducerbarhed med et potent referenceøstrogen, en stærk østrogenreceptoragonist og et negativt referencekemikalie (4)(5)(6)(7)(8)(9). Denne testmetode B.54 bygger på erfaringerne fra valideringstestprogrammet og de derved opnåede resultater med østrogenagonister.

2. Det uterotrofiske bioassay er en korttidsscreeningtest, der havde sin oprindelse i 1930'erne (27)(28) og først blev standardiseret til screening af et ekspertudvalg i 1962 (32)(35). Det er baseret på forøgelsen af uterusvægt eller uterotrofisk respons (se gennemgang i 29). Det evaluerer et kemikalies evne til at fremkalde biologiske aktiviteter i overensstemmelse med agonister eller antagonister i naturlige østrogener (f.eks. 17ß-estradiol). Det bruges dog langt mindre til påvisning af antagonister end af agonister. Uterus reagerer på østrogener på to måder. En første reaktion er en vægtforøgelse på grund af vandimbibition. Denne reaktion efterfølges af vægtforøgelse på grund af vævsvækst (30). Uterusreaktioner hos rotter og mus er kvalitativt sammenlignelige.

3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningassay, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (tillæg 2). I denne konceptramme ligger det uterotrofiske bioassay på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en enkelt endokrin mekanisme, nemlig østrogenicitet.

4. Det uterotrofiske bioassay er beregnet til at blive inkluderet i en række in vitro- og in vivo-test med henblik på at afdække kemikalier med potentiale til at interagere med det endokrine system, så man i sidste ende kan foretage vurderinger af risici for menneskers sundhed og miljøet. OECD's valideringsprogram anvendte både stærke og svage østrogenagonister til at vurdere, hvor effektivt assayet kan identificere østrogene kemikalier (4)(5)(6)(7)(8). Derved blev testprocedurens følsomhed over for østrogenagonister påvist ud over en god reproducerbarhed i og mellem laboratorier.

5. Med hensyn til negative kemikalier blev der kun medtaget ét »negativt« referencekemikalie, der allerede var rapporteret negativt ved uterotrofisk assay samt in vitro-receptorbinding og receptorassays i valideringsprogrammet, men supplerende testdata, som ikke vedrørte OECD-valideringsprogrammet, er blevet evalueret og har yderligere underbygget specificiteten af det uterotrofiske bioassay til screening for østrogenagonister (16).

▼**M5**

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

6. Østrogenagonister og -antagonister fungerer som ligander for østrogenreceptorer a og b og kan henholdsvis aktivere eller hæmme receptorernes transkriptionsaktivitet. Dette kan potentielt føre til sundhedsrisici, herunder skadevirkninger for reproduktion og udvikling. Derfor er der behov for hurtigt at kunne vurdere og evaluere et kemikalie som en mulig østrogenagonist eller -antagonist. Selv om en ligands affinitet for en østrogenreceptor eller transkriptionsaktivering af reportergener in vitro er informativ, er det kun en af flere determinanter for mulig fare. Andre determinanter kan omfatte metabolisk aktivering og deaktivering ved optagelse i kroppen, fordeling til målvæv og clearance fra kroppen, i hvert fald delvis afhængigt af indgiftsvejen og det kemikalie, der testes. Dette medfører behov for at screene et kemikalies mulige aktivitet in vivo under relevante betingelser, medmindre kemikaliets kendetegn vedrørende Absorption — Distribution — Metabolisme — Eliminering (ADME) allerede giver tilstrækkelig information. Uterusvæv reagerer med hurtig og kraftig vækst på stimulering med østrogener, især hos forsøgsgnavere, hvor brunstcyklussen varer ca. fire dage. Gnaverarter, navnlig rotten, anvendes også bredt i toksicitetsundersøgelser til risikobeskrivelse. Derfor er gnaverens uterus et egnet målorgan for in vivo-screening af østrogenagonister og -antagonister.

7. Denne testmetode er baseret på de protokoller, der blev anvendt i OECD's valideringsundersøgelse, og som har vist sig at være pålidelige og repeterbare i intra- og interlaboratorieundersøgelser (5)(7). I øjeblikket findes der to metoder, nemlig den ovariektomiserede metode for voksne hunner (OVX-voksen-metode) og den ikkekønsmodne ikkeovariektomiserede metode (den ikkekønsmodne metode). Det blev påvist i OECD-valideringstestprogrammet, at begge metoder har sammenlignelig følsomhed og reproducerbarhed. Da den ikkekønsmodne metode har en intakt HPG-akse (hypotalamus-hypofyse-gonade) er den dog noget mindre specifik, men dækker et bredere undersøgelsesområde end det ovariektomiserede dyr, fordi den kan reagere på kemikalier, der interagerer med HPG-aksen i stedet for blot østrogenreceptoren. Rottens HGP-akse er funktionel omkring 15-dages alderen. Før kan puberteten ikke fremskyndes med behandlinger som GnRH. Da hunner begynder at komme i puberteten før åbningen af vagina, vil hunnen have flere stille cyklusser, der ikke fører til vaginalåbning eller ovulation, men der er visse hormonale svingninger. Hvis et kemikalie stimulerer HPG-aksen direkte eller indirekte, medfører det for tidligt indtrædende pubertet, tidlig ovulation og fremskyndet vaginalåbning. Det er ikke kun kemikalier, der påvirker HPG-aksen, som gør dette, men nogle former for foder med højere niveauer af omsættelig energi end andre vil stimulere vækst og fremskynde vaginalåbning uden at være østrogene. Sådanne kemikalier vil ikke fremkalde en uterotrofisk reaktion ved OVX på voksne dyr, da deres HPG-akse ikke fungerer.

8. Af hensyn til dyrevelfærden foretrækkes metoden med ikkekønsmodne rotter, da man undgår kirurgisk forbehandling af dyrene og også undgår, at dyr, som ser ud til at være ved at gå i brunst, evt. ikke anvendes (se pkt. 30).

▼**M5**

9. Den uterotrofiske respons har ikke udelukkende østrogen oprindelse, dvs. at andre kemikalier end østrogenagonister og -antagonister også kan give en reaktion. F.eks. kan relativt høje doser af progesteron, testosteron eller forskellige syntetiske progestiner alle føre til en stimulerende reaktion (30). En evt. reaktion kan analyseres histologisk for keratinisering og forhorning af vagina (30). Uanset reaktionens mulige oprindelse bør et positivt udfald af et uterotrofisk bioassay normalt give anledning til handling med henblik på yderligere afklaring. Supplerende tegn på østrogenicitet kan komme fra in vitro-assays såsom assays om ER-binding og transkriptionsaktivering eller fra andre in vivo-assays såsom assayet om kvindelig pubertet.

10. Under hensyntagen til, at det uterotrofiske bioassay fungerer som et in vivo-screeningassay, tjente den anvendte valideringstilgang både dyrevelfærdshensyn og en trinvis teststrategi. Med henblik herpå bestræbte man sig på at foretage en streng validering af reproducerbarhed og følsomhed for østrogenicitet — den vigtigste bekymring i forbindelse med mange kemikalier — mens antiøstrogenecitetselementet i assayet ikke fik megen opmærksomhed. Kun ét antiøstrogen med stærk aktivitet blev testet, eftersom antallet af kemikalier med en klar antiøstrogen profil (ikke tilsløret af en vis østrogenaktivitet) er meget begrænset. Således er denne testmetode dedikeret til den østrogene protokol, mens protokollen med beskrivelse af assayets antagonistform er indeholdt i en vejledning (37). Assayets reproducerbarhed og følsomhed for kemikalier med rent antiøstrogen aktivitet vil blive tydeligere defineret senere, når testproceduren har været anvendt rutinemæssigt i nogen tid, og flere kemikalier med denne virkningsmodalitet er blevet identificeret.

11. Det er anerkendt, at alle dyrebaserede procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af dyr. Nedenstående beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (38). OECD har udarbejdet yderligere vejledning om human behandling af dyr (25).

12. Som med alle assays, der anvender levende dyr, er det væsentligt at sikre, at dataene virkelig er nødvendige, før assayet påbegyndes. Eksempler på to forhold, hvor data kan være påkrævet:

— højt eksponeringspotentiale (niveau 1 i konceptrammen, tillæg 2) eller tegn på østrogenicitet (niveau 2) for at undersøge, hvorvidt sådanne virkninger kan optræde in vivo

— virkninger, der indikerer østrogenicitet i in vivo-test på niveau 4 eller 5, for at underbygge, at virkningerne var knyttet til en østrogen mekanisme, som ikke kan klarlægges ved hjælp af in vitro-test.

13. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

▼M5

PRINCIP FOR TESTEN

14. Af hensyn til følsomheden bygger det uterotrofiske bioassay på et dyreforsøgssystem, hvor hypotalamus-hypofyse-ovarieaksen ikke er funktionel, hvilket fører til lave endogene niveauer af cirkulerende østrogen. Det vil sikre, at uterus har en lav udgangsvægt, og at der bliver en maksimal spredning af reaktioner på indgivne østrogener. To østrogenfølsomme tilstande hos hungnavere opfylder dette krav:

i) ikkekønsmodne hunner efter fravænning og før pubertet

ii) unge voksne hunner efter ovariektomi med tilstrækkelig tid til regression af uterusvævet.

15. Testkemikaliet indgives dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion. Graduerede testkemikaliedoser indgives til mindst to behandlingsgrupper (se vejledning i pkt. 33) af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe og en indgiftsperiode på tre på hinanden følgende dage for den ikkekønsmodne metode og en indgiftsperiode på mindst tre på hinanden følgende dage for OVX-voksen-metoden. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. For østrogenagonister undersøges behandlede dyregruppers gennemsnitlige uterusvægt i forhold til vehikelgruppen for en statistisk signifikant forøgelse. En statistisk signifikant forøgelse i gennemsnitlig uterusvægt for en testgruppe viser en positiv respons i dette bioassay.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

16. Der kan bruges almindeligt anvendte gnaverstammer. Som eksempel blev Sprague-Dawley og Wistar-stammer af rotter anvendt under valideringen. Stammer med uteri, som man ved eller har mistanke om, er mindre responsive, bruges ikke. Laboratoriet skal påvise den anvendte stammes følsomhed som foreskrevet i pkt. 26 og 27.

17. Rotter og mus er rutinemæssigt blevet anvendt i det uterotrofiske bioassay siden 1930'erne. OECD's valideringsundersøgelser blev kun udført med rotter baseret på en forståelse af, at begge arter forventes at være ækvivalente, og derfor burde én art være nok til den globale validering med henblik på at spare ressourcer og dyr. Rotten er den foretrukne art i de fleste reproduktions- og udviklingstoksicitetsundersøgelser. Eftersom der findes en omfattende historisk database for mus og for derfor at udvide anvendelsesområdet for den uterotrofiske bioassay-testmetode med gnavere til anvendelsen af mus som forsøgsarter, blev der udført en begrænset opfølgende valideringsundersøgelse med mus (16). En 'bridging'-metode med et begrænset antal testkemikalier og deltagende laboratorier og uden kodet stikprøvetest blev valgt i overensstemmelse med det oprindelige ønske om at spare ressourcer og dyr. Denne 'bridging'-valideringsundersøgelse viser for det uterotrofiske bioassay med unge vokse ovariektomiserede mus, at data opnået med rotter og mus kvalitativt og kvantitativt stemmer udmærket overens. Selv om resultatet af det uterotrofiske bioassay måske er foreløbigt i forhold til en langtidsundersøgelse, giver det mulighed for, at dyr fra den samme stamme og kilde kan anvendes i begge undersøgelser. 'Bridging'-metoden blev begrænset til OVX-mus, og rapporten giver ikke et robust datasæt, der kan validere den ikkekønsmodne model. Den ikkekønsmodne model for mus kommer således ikke i betragtning under den nuværende testmetodes anvendelsesområde.

▼M5

18. I nogle tilfælde kan mus derfor anvendes i stedet for rotter. Denne art skal begrundes i toksikologiske, farmakokinetiske og/eller andre kriterier. Ændringer i protokollen kan være nødvendige for mus. F.eks. er mus' fødeindtagelse målt på kropsvægt højere end rotters, og derfor skal det fytoøstrogene indhold i foderet være lavere for mus end for rotter(9)(20)(22).

Miljøbetingelser og fodring

19. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Disse beskrivelser af pasning og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (38). Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke.

20. Laboratoriefoder og drikkevand gives ad libitum. Unge voksne dyr kan opbevares i bure hver for sig eller i grupper på op til tre dyr. På grund af de ikkekønsmodne dyrs unge alder anbefales social gruppeanbringelse

21. Et højt fytoøstrogenniveau i laboratoriefoder er kendt for at øge uterusvægten hos gnavere i tilstrækkelig grad til at påvirke det uterotrofiske bioassay (13)(14)(15). Et højt niveau af fytoøstrogener og omsættelig energi i laboratoriefoder kan også føre til tidlig pubertet, hvis der anvendes ikkekønsmodne dyr. Tilstedeværelsen af fytoøstrogener stammer primært fra tilsætningen af soja- og lucerneprodukter i laboratoriefoderet, og koncentrationer af fytoøstrogener i standardlaboratoriefoder har vist sig at variere fra batch til batch (23). Kropsvægt er en vigtig variabel, da den hænger sammen med mængden af indtaget foder. Derfor varierer den faktisk indtagne dosis fytoøstrogen fra samme foder mellem arter og efter alder (9). For ikkekønsmodne hunrotter kan fødeindtagelsen målt efter kropsvægt være ca. det dobbelte af indtagelsen for ovariektomiserede unge voksne hunner. For unge voksne mus kan fødeindtagelsen målt efter kropsvægt være næsten det firedobbelte af indtagelsen for ovariektomiserede unge voksne hunrotter.

22. Resultater af det uterotrofiske bioassay (9)(17)(18)(19) viser imidlertid, at begrænsede mængder af fytoøstrogener i foderet er acceptabelt og ikke reducerer bioassayets følsomhed. Vejledende bør fytoøstrogenniveauerne i foder ikke overstige 350 μg genistein-ækvivalenter/gram laboratoriefoder til ikkekønsmodne Sprague Dawley- og Wistar-hunrotter (6)(9). Et sådant foder bør også være passende ved test på unge voksne ovariektomiserede rotter, fordi fødeindtagelsen målt efter kropsvægt er mindre hos unge voksne sammenlignet med ikkekønsmodne dyr. Hvis voksne ovariektomiserede mus eller mere fytoøstrogenfølsomme rotter anvendes, skal man overveje en forholdsmæssig reduktion i fytoøstrogenniveauet i foderet (20). Endvidere kan forskelle i tilgængelig metabolisk energi fra forskelligt foder føre til tidsforskydninger i pubertetens start (21)(22).

▼M5

23. Forud for undersøgelsen kræves en omhyggelig udvælgelse af foder uden et højt fytoøstrogenniveau (se vejledning (6)(9)) eller metabolisk energi, der kan forstyrre resultaterne (15)(17)(19)(22)(36). Det er en vigtig kontrol af begge disse faktorer at sikre, at laboratoriets testsystem fungerer korrekt som fastsat i pkt. 26 og 27. Som en beskyttelsesforanstaltning i overensstemmelse med god laboratoriepraksis (GLP) udtages der repræsentative prøver af hver batch foder, som indgives i løbet af undersøgelsen, med henblik på mulig analyse af fytoøstrogenindholdet (f.eks. i tilfælde af høj uteruskontrolvægt i forhold til tidligere kontroller eller en uhensigtsmæssig respons på referenceøstrogenet, 17-alfa-ethinylestradiol). Alikvoter analyseres som led i undersøgelsen eller fryses ved – 20 °C eller på en sådan måde, at prøven ikke nedbrydes før analyse.

24. Nogle former for strøelse kan indeholde naturligt forekommende østrogene eller antiøstrogene kemikalier (f.eks. er det kendt, at majskolber påvirker rotters cyklus og ser ud til at være antiøstrogene). Det valgte strøelsesmateriale skal indeholde så lidt østrogen som muligt.

Forberedelse af dyr

25. Forsøgsdyr uden tegn på sygdom eller fysiske abnormiteter tilordnes vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper. Burene anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Dyrene mærkes individuelt. Ikkekønsmodne dyr opbevares helst i bur med moderdyr eller plejemoderdyr indtil fravænning under akklimatisering. Akklimatiseringsperioden forud for undersøgelsens start skal være omkring fem dage for unge voksne dyr og for ikkekønsmodne dyr leveret med moderdyr eller plejemoderdyr. Såfremt der fås fravænnede ikkekønsmodne dyr uden moderdyr, kan en kortere akklimatiseringsperiode blive nødvendig, da dosering skal starte umiddelbart efter fravænning (se pkt. 29).

FREMGANGSMÅDE

Kontrol af laboratoriets kompetence

26. Der er to forskellige muligheder for at kontrollere laboratoriets kompetence:

— periodisk kontrol i forhold til en indledende positiv grundkontrolundersøgelse (se pkt. 27). Mindst hver sjette måned og hver gang der sker en ændring, som kan påvirke assayets resultater (f.eks. en ny foderformulering, ændringer i dissektionspersonale, ændring af dyrestamme eller -leverandør osv.), skal testsystemets (dyremodellens) responsivitet kontrolleres ved hjælp af en passende dosis (baseret på den positive grundkontrol, jf. pkt. 27) af et referenceøstrogen: 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE)

— brug af sideløbende kontroller ved at inkludere en gruppe, som får en passende dosis referenceøstrogen, i hvert assay.

Reagerer systemet ikke som forventet, skal testbetingelserne undersøges og ændres i overensstemmelse hermed. Det anbefales, at den dosis referenceøstrogen, der skal anvendes ved hver tilgang, er ca. ED70-80.

▼M5

27. **Positiv grundkontrolundersøgelse** — Før et laboratorium første gang gennemfører en undersøgelse i henhold til denne testmetode,påvises laboratoriets kompetence gennem en test af dyremodellens responsivitet ved at fastlægge et referenceøstrogens dosisrespons: 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE) med minimum fire doser. Uterusvægtrespons sammenlignes med etablerede tidligere data (se reference (5)). Hvis denne positive grundkontrol ikke giver de forventede resultater, undersøges testbetingelserne og ændres.

Dyrenes antal og vilkår

28. Hver behandlings- og kontrolgruppe skal omfatte mindst seks dyr (gælder protokoller for både den ikkekønsmodne og OVX-voksen-metoden).

Ikkekønsmodne dyrs alder

29. Til det uterotrofiske bioassay med ikkekønsmodne dyr skal fødselsdatoen anføres. Doseringen skal begynde tidligt nok til at sikre, at den fysiologiske forøgelse af endogene østrogener i forbindelse med puberteten endnu ikke har fundet sted, når indgiften af testkemikaliet afsluttes. På den anden side er der tegn på, at meget unge dyr kan være mindre følsomme. Ved definering af den optimale alder skal hvert laboratorium tage udgangspunkt i sine egne baggrundsdata om kønsmodning.

Som generel vejledning kan dosering af rotter begynde straks efter en tidlig fravænning på PND 18 (idet dagen for fødslen er PND 0). Dosering af rotter skal helst fuldføres på PND 21, men under alle omstændigheder før PND 25, for efter den alder bliver hypothalamus-hypofyse-ovarie-aksen funktionel, og det endogene østrogenniveau kan begynde at stige med en samtidig stigning i uterus' gennemsnitlige basislinjevægt og en stigning i gruppens standardafvigelser (2)(3)(10)(11)(12).

Procedure for ovariektomi

30. For ovariektomiserede hunrotter og -mus (behandlings- og kontrolgrupper) foretages ovariektomi i 6-8-ugersalderen. For rotter skal der gå mindst 14 dage mellem ovariektomi og den første dags indgift for at give uterus mulighed for at trække sig sammen til en minimal stabil basislinje. For mus skal der gå mindst syv dage mellem ovariektomi og den første dags indgift. Da små mængder ovarievæv er tilstrækkelige til at producere betydelige mængder af cirkulerende østrogen (3), skal dyrene testes før brug ved at observere epithelceller skrabet fra vagina i mindst fem på hinanden følgende dage (f.eks. dag 10-14 efter ovariektomi for rotters vedkommende). Hvis dyrene viser tegn på, at de er ved at gå i brunst, skal de ikke bruges. Ved obduktion skal ovariestilkene undersøges for tegn på evt. tilstedeværelse af ovarievæv. I givet fald skal dyret ikke anvendes i beregningerne (3).

31. Ovariektomiproceduren begynder med, at dyret bedøves korrekt og lægges på maven. Incisionen til åbning af den dorsolaterale abdominalvæg skal være ca. 1 cm på langs ved midtpunktet mellem ribbenenes margo inferior og crista iliaca og nogle få millimeter lateralt i forhold til lændemusklens laterale kant. Ovariet fjernes fra bughulen til et aseptisk felt. Ovariet skæres fra ved overgangen mellem æggeleder og corpus uteri. Efter bekræftelse af, at der ikke forekommer massiv blødning, lukkes abdominalvæggen med sutur, og huden lukkes med autoclips eller egnet sutur. Ligaturpunkterne vises skematisk i figur 1. Passende postoperativ analgesi bruges som anbefalet af en dyrlæge med erfaring i pleje af gnavere.

▼M5

Kropsvægt

32. I OVX-voksen-metoden hænger kropsvægt og uterusvægt ikke sammen, fordi uterusvægten påvirkes af hormoner såsom østrogener, men ikke af vækstfaktorer, der regulerer kropsstørrelsen. Derimod hænger kropsvægten sammen med uterusvægten i den ikkekønsmodne model under kønsmodning (34). Ved påbegyndelse af undersøgelsen skal vægtvariationen for de anvendte dyr i den ikkekønsmodne model derfor være minimal og må ikke overstige ± 20 % af middelvægten. Det betyder, at kuldstørrelsen skal være standardiseret af producenten for at sikre, at afkom fra andre moderdyr bliver fodret med det samme. Dyr tilordnes til grupper (kontrol- og behandlingsgrupper) ved randomiseret vægtfordeling, således at hver gruppes gennemsnitlige kropsvægt ikke er statistisk anderledes end en anden gruppes. Man skal, så vidt det er praktisk muligt, være opmærksom på ikke at tilordne dyr fra samme kuld til samme behandlingsgruppe uden at øge antallet af kuld, der anvendes til undersøgelsen.

Dosering

33. For at fastslå, om et testkemikalie kan have østrogen virkning in vivo, er to dosisgrupper og en kontrolgruppe normalt tilstrækkeligt, og dette design foretrækkes derfor af hensyn til dyrevelfærden. Hvis formålet er enten at opnå en dosisrepræsentativ kurve eller at ekstrapolere til lavere doser, er der behov for mindst tre dosisgrupper. Hvis der kræves information ud over identificeringen af østrogen aktivitet (såsom et skøn over styrke), må man overveje et andet dosisregime. Med undtagelse af behandling med testkemikaliet behandles dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der bruges et vehikel til indgift af testkemikaliet, skal kontrolgruppen modtage den samme mængde vehikel, som bruges til den behandlede gruppe (eller den største mængde, der bruges til testgrupperne, hvis der er forskel grupperne imellem).

34. Formålet i tilfælde af det uterotrofiske bioassay er at vælge doser, der sikrer dyrenes overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller lidelse for dyrene efter tre på hinanden følgende dages indgift af kemikaliet indtil en maksimal dosis på 1 000 mg/kg/dag. Alle dosisniveauer foreslås og vælges under hensyntagen til evt. eksisterende toksicitets- og (toksiko-)kinetiske data om testkemikaliet eller materiale i den forbindelse. Med hensyn til det højeste dosisniveau skal der først tages hensyn til LD50 og/eller information om akut toksicitet for at undgå død eller alvorlig lidelse for dyrene (24)(25)(26). Den højeste dosis repræsenterer den maksimalt tolererede dosis (MTD). En undersøgelse foretaget med et dosisniveau, som skabte en positiv uterotrofisk respons, ville også blive godkendt. Til screening er store intervaller (f.eks. enheder a en halv logaritme svarende til en dosisprogression på 3,2 eller op til enheder a en logaritme) mellem doseringerne normalt acceptable. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres en range-finding-undersøgelse til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.

35. Hvis den østrogene styrke for en agonist kan anslås ved in vitro- (eller in silico-) data, kan disse alternativt inddrages med henblik på valg af dosis. F.eks. anslås den mængde af testkemikaliet, som vil fremkalde uterotrofisk respons svarende til referenceagonisten (ethinylestradiol), efter sine relative in vitro-styrker i forhold til ethinylestradiol. Man vil få den højeste testdosis ved at gange denne ækvivalente dosis med en passende faktor, f.eks. 10 eller 100.

▼M5

Overvejelser over 'range-finding'

36. Om nødvendigt kan der udføres en range-finding-undersøgelse med nogle få dyr. I den forbindelse kan OECD's vejledning nr. 19 (25) bruges til at definere kliniske tegn på toksicitet eller lidelse for dyrene. Såfremt det er muligt inden for denne range-finding-undersøgelse, kan uteri efter tre dages indgift eksciseres og vejes ca. 24 timer efter den sidste dosis. Disse data kan herefter bruges som input til design af hovedundersøgelsen (vælg en acceptabel maksimumsdosis og lavere doser, og anbefal antallet af dosisgrupper).

Indgift af doser

37. Testkemikaliet indgives ved oral sonde eller subkutan injektion. Dyrevelfærdshensyn og toksikologiske aspekter såsom relevansen for den måde, hvorpå mennesker eksponeres for kemikaliet (f.eks. oral sonde til modelindtagelse, subkutan injektion til modelinhalation eller dermal absorption), testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og især eksisterende toksikologisk information og data om metabolisme og kinetik (f.eks. behov for at undgå førstepassage-metabolisme, bedre effektivitet ad en særlig vej) skal tages i betragtning ved valg af indgiftsvej.

38. Det anbefales først at overveje en vandig opløsning/suspension, hvor det er muligt. Men da de fleste østrogene ligander eller deres metaboliske prækursorer normalt er hydrofobe, er den mest almindelige fremgangsmåde at anvende en opløsning/suspension i olie (f.eks. majs-, jordnødde-, sesam- eller olivenolie). Disse olier har imidlertid forskelligt kalorie- og fedtindhold, og vehiklet kan derfor påvirke det samlede indtag af omsættelig energi og derved potentielt ændre de målte endepunkter såsom uterusvægt, især ved den ikkekønsmodne metode (33). Forud for undersøgelsen testes derfor ethvert vehikel, der skal anvendes, i forhold til kontrolgrupper uden vehikel. Testkemikalier kan opløses i en minimal mængde på 95 % ethanol eller andre egnede opløsningsmidler og fortyndes til endelige arbejdskoncentrationer i testvehiklet. Opløsningsmidlets toksiske karakteristika skal være kendt og testes i en særskilt kontrolgruppe, som kun får opløsningsmiddel. Hvis testkemikaliet anses for stabilt, kan svag opvarmning og kraftig mekanisk påvirkning bruges til at fremme opløsningen af testkemikaliet. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Er testkemikaliet stabilt, mens undersøgelsen står på, kan en startalikvot af testkemikaliet klargøres, og de angivne fortyndinger af dosis tilberedes dagligt.

39. Doseringstidspunktet vil afhænge af den anvendte model (jf. pkt. 29 om den ikkekønsmodne model og pkt. 30 om OVX-voksen-modellen). Ikkekønsmodne hunrotter doseres dagligt med testkemikaliet i tre på hinanden følgende dage. En tredages behandling anbefales også til ovariektomiserede hunrotter, men længere eksponeringer er acceptable og kan forbedre detektionen af svagt aktive kemikalier. For ovariektomiserede hunmus skulle en anvendelsesvarighed på tre dage være tilstrækkeligt uden en væsentlig fordel ved en udvidelse på op til syv dage for stærke østrogenagonister. Denne sammenhæng blev dog ikke påvist for svage østrogener i valideringsundersøgelsen (16), så doseringen skal udvides til syv på hinanden følgende dage for OVX-voksne mus.Dosis indgives på samme tidspunkter hver dag. Doserne justeres efter behov, så der bevares en konstant dosis i forhold til dyrets kropsvægt (f.eks. mg af testkemikaliet pr. kg kropsvægt pr. dag). Med hensyn til testvolumen skal variationen på grundlag af kropsvægt begrænses ved at justere koncentrationen af testopløsningen for at sikre et konstant volumen på grundlag af kropsvægt ved alle dosisstørrelser og for alle indgiftsveje.

▼M5

40. Når testkemikaliet indgives ved sonde, skal dyrene have det i en enkeltdosis ved hjælp af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en daglig væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Lokale retningslinjer for pleje af dyr skal følges, men mængden bør ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt.

41. Når testkemikaliet indgives ved subkutan injektion, skal det ske i en enkelt daglig dosis. Doserne indgives i de dorsoskapulære og lumbale regioner via steril nål (f.eks. kaliber 23 eller 25) og en tuberkulinsprøjte. Det er valgfrit, om injektionsområdet barberes. Evt. tab eller lækage på injektionsstedet eller ufuldstændig dosering registreres. Den samlede injicerede mængde pr. rotte pr. dag må ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt fordelt på to injektionssteder undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt.

Bemærkninger

Generelle og kliniske observationer

42. Generelle kliniske observationer foretages mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationer skal helst udføres på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til perioden for den forventede maksimale virkning efter dosering. Alle dyr observeres for mortalitet, morbiditet og generelle kliniske tegn såsom ændringer i adfærd, hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster).

Kropsvægt og foderindtagelse

43. Alle dyr vejes dagligt til nærmeste 0,1 g fra indledningen af behandlingen, dvs. når dyrene fordeles i grupper. Som valgfri måling kan mængden af indtaget foder i behandlingsperioden måles pr. bur ved at veje fodringssystemerne. Resultaterne for foderindtagelsen udtrykkes i gram pr. rotte pr. dag.

Dissektion og måling af uterusvægt

44. 24 timer efter den sidste behandling aflives rotterne humant. Ideelt set skal obduktionsrækkefølgen være vilkårlig på tværs af grupperne for at undgå progression direkte op eller ned i forhold til dosisgrupper, som kan påvirke dataene lidt. Formålet med bioassayet er at måle både vådvægten og tørvægten af uterus. Vådvægten omfatter uterus og luminalvæskeindhold. Tørvægten måles, efter at luminalindholdet af uterus er blevet presset ud og fjernet.

45. Før dissektion skal vagina undersøges med hensyn til åbningsstatus hos ikkekønsmodne dyr. Dissektionsproceduren begynder ved at åbne abdominalvæggen ved skambenssymfysen. Herefter fjernes evt. livmoderhorn og ovarier fra den dorsale abdominalvæg. Urinblære og urinledere fjernes fra den ventrale og laterale side af uterus og vagina. Fibrøs adhæsion mellem rektum og vagina fjernes, til forbindelsespunktet mellem vaginalåbning og perinealhud kan identificeres. Uterus og vagina frigøres fra kroppen ved foretage en incision i vaginalvæggen lige over forbindelsespunktet i perinealhuden som vist i figur 2. Uterus fjernes fra kropsvæggen ved forsigtigt at skære det uterine mesenterium dorsolateralt ved tilhæftningspunktet i hele længden af hvert livmoderhorn. Når uterus er fjernet fra kroppen, skal håndteringen gå tilstrækkelig hurtigt til, at vævsudtørring undgås. Vægttab på grund af udtørring bliver større ved små væv såsom uterus (23). Er der ovarier, fjernes disse ved æggelederen, idet tab af luminalvæske fra livmoderhornet undgås. Såfremt dyret er blevet ovariektomiseret, undersøges ovariestilkene for tilstedeværelse af evt. ovarievæv. Overskydende fedt og

▼M5

bindevæv renses væk. Vagina fjernes fra uterus lige under cervix, således at cervix forbliver sammen med corpus uteri som vist i figur 2.

46. Hver uterus overføres til en entydigt mærket og vejet beholder (f.eks. en petriskål eller et plastvejekar), idet man fortsat omhyggeligt undgår udtørring før vejning (f.eks. kan filterpapir, der er let fugtet med saltvand, lægges i beholderen). Uterus med luminalvæske vejes til nærmeste 0,1 mg (uterus' vådvægt).

47. Hver uterus behandles herefter individuelt med henblik på fjernelse af luminalvæske. Begge livmoderhorn perforeres eller skæres på langs. Uterus placeres på et let fugtigt filterpapir (f.eks. Whatman nr. 3) og presses forsigtigt med et andet stykke let fugtigt filterpapir, så luminalvæsken fjernes helt. Uterus uden luminalvæske vejes til nærmeste 0,1 mg (uterus' tørvægt).

48. Vægten af uterus ved testens afslutning kan bruges til at sikre, at den ikkekønsmodne intakte rottes rette alder ikke blev overskredet. Dog er tidligere data om den rottestamme, laboratoriet anvendte, afgørende i den forbindelse (se pkt. 56 med hensyn til fortolkning af resultaterne).

Valgfrie undersøgelser

49. Efter vejning kan uterus fikseres i 10 % neutral bufferformalin med henblik på histopatologisk undersøgelse efter hematoxylin-eosin (HE)-farvning. Vagina kan undersøges i overensstemmelse hermed (se pkt. 9). Endvidere kan der med henblik på kvantitativ sammenligning foretages en morfometrisk måling af endometrial epithelium.

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Undersøgelsesdataene skal omfatte:

— antal dyr ved assayets start

— antal dyr, der blev fundet døde under assayet eller aflivet af humane grunde, og deres identitet samt dato og tidspunkt for evt. død eller human aflivning

— antal dyr, der viser tegn på toksicitet, og deres identitet samt en beskrivelse af de observerede tegn på toksicitet, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle toksiske virkninger

— antal dyr, der udviser læsioner, og deres identitet samt en beskrivelse af læsionernes art.

▼**M5**

51. Individuelle dyredata registreres med kropsvægt, vådvægt af uterus og tørvægt af uterus. Ensidede statistiske analyser for agonister anvendes til at bestemme, om indgiften af et testkemikalie har ført til en statistisk signifikant ($p < 0,05$) stigning i uterusvægt. Passende statistiske analyser udføres for at teste, om der er behandlingsrelaterede ændringer i tør- og vådvægt af uterus. F.eks. kan dataene vurderes ved en kovariansanalysemetode (ANCOVA) med kropsvægt ved obduktion som kovariablen. En variansstabiliserende logaritmisk transformation kan udføres på uterusdata forud for dataanalysen. Dunnett og Hsus test er hensigtsmæssig til at foretage parvise sammenligninger af hver dosisgruppe i forhold til vehikelkontrolgrupperne og til at beregne konfidensintervaller. Studentiserede residualplots kan bruges til at detektere mulige outliers og til at vurdere variansernes homogenitet. Disse procedurer blev anvendt i OECD's valideringsprogram, der benytter PROC GLM i det statistiske analysesystem (SAS Institute, Cary NC), version 8 (6)(7).

52. Den endelige rapport skal indeholde:

Testlaboratorium

— ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar

— data fra den positive basislinjekontroltest og periodiske positive kontroldata (se pkt. 26 og 27).

Testkemikalie

— karakterisering af testkemikalier

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— blanding af fortyndinger: metode og frekvens

— evt. data genereret vedrørende stabilitet

— evt. analyser af testopløsninger.

Vehikel

— karakterisering af testvehikel (art, leverandør og batch)

— begrundelse for valg af vehikel (hvis andet end vand).

Forsøgsdyr

— art og stamme samt begrundelse for valget heraf

— leverandør og særlig leverandør

— alder ved levering med fødselsdato

— ved ikkekønsmodne dyr, om de er leveret med moder- eller plejedyr og dato for fravænning

— oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr

— antal dyr pr. bur

— oplysninger om metode til individuel identifikation af dyr og grupper.

Assaybetingelser

— oplysninger om randomiseringsproces (dvs. anvendt metode)

— rationale for valg af dosis

▼**M5**

— oplysninger om testkemikaliets formulering, opnåede koncentrationer heraf, stabilitet og homogenitet

— oplysninger om indgift af testkemikalie og rationale for valg af eksponeringsvej

— foder (navn, type, leverandør, indhold, og hvis det er kendt, fytoøstrogenniveau)

— vandkilde (f.eks. hanevand eller filtreret vand) og tilførsel (ved rør fra en stor beholder, i flasker osv.)

— strøelse (navn, type, leverandør, indhold)

— registrering af anbringelsesforhold, belysningsinterval, rumtemperatur og luftfugtighed, rengøring af rummet

— detaljeret beskrivelse af procedurer for obduktion og vejning af uterus

— beskrivelse af statistiske procedurer.

Resultater

For individuelle dyr

— vægt fra alle daglige individuelle kropsvejninger (fra fordeling i grupper til obduktion) (til nærmeste 0,1 g)

— hvert dyrs alder (i dage, idet fødselsdagen regnes som dag 0), når indgift af testkemikaliet begynder

— dato og tidspunkt for indgift af hver dosis

— beregnet volumen og dosering indgivet og observationer af evt. doseringstab under eller efter indgiften

— daglig registrering af status for dyr, herunder relevante symptomer og observationer

— mistænkt dødsårsag (hvis fundet under undersøgelsen i moribund tilstand eller død)

— dato og tidspunkt for human aflivning med tidsinterval til seneste dosering

— vådvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg) og evt. observationer af luminale væsketab under dissektion og forberedelse til vejning

— tørvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg).

For hver gruppe af dyr

— gennemsnitlig daglig kropsvægt (til nærmeste 0,1 g) og standardafvigelser (fra fordeling i grupper til obduktion)

— gennemsnitlig vådvægt af uterus og gennemsnitlig tørvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg) og standardafvigelser

— daglig foderindtagelse, hvis den måles (beregnet som gram foderindtagelse pr. dyr)

▼M5

— resultater af statistiske analyser med sammenligning af både våd- og tørvægt af uterus for behandlede grupper i forhold til de samme målinger i vehikelkontrolgrupperne

— resultater af statistisk analyse med sammenligning af den samlede kropsvægt og kropsvægtforøgelsen i de behandlede grupper i forhold til de samme målinger i vehikelkontrolgrupperne.

53. Resumé af vigtige vejledningsoplysninger om testmetoden

	Rotte	Mus
Dyr		
Stamme	Stamme af almindeligt anvendte forsøgsgnavere	
Antal dyr	Minimum seks dyr pr. dosisgruppe	
Antal grupper	Minimum to testgrupper (se vejledning i pkt. 33) og en negativ kontrolgruppe Med hensyn til vejledning om positive kontrolgrupper henvises til pkt. 26 og 27.	
Miljøbetingelser og fodring		
T° i forsøgslokalet	22 °C ± 3 °C	
Relativ luftfugtighed	50-60 % og ikke under 30 % eller over 70 %	
Daglig belysningssekvens	12 timers lys, 12 timers mørke	
Foder og drikkevand	Ad libitum	
Anbringelse	Individuelt eller i grupper på op til tre dyr (social gruppeanbringelse anbefales for ikkekønsmodne dyr)	
Foder og strøelse	Fytoøstrogener med lavt niveau anbefales i foder og strøelse	
Protokol		
Metode	Den ikkekønsmodne, ikkeovariektomiserede metode (den foretrukne) Den ovariektomiserede metode for voksne hunner	Den ovariektomiserede metode for voksne hunner
Alder for dosering af ikkekønsmodne dyr	Tidligst PND 18. Dosering skal være afsluttet før PND 25	Ikke relevant under den aktuelle testmetodes anvendelsesområde
Alder for ovariektomi	Mellem seks og otte uger	
Alder for dosering af ovariektomiserede dyr	Der skal gå mindst 14 dage mellem ovariektomi og den første indgiftsdag.	Der skal gå mindst syv dage mellem ovariektomi og den første indgiftsdag.
Kropsvægt	Variation i kropsvægt skal være minimal og må ikke overstige ± 20 % af middelvægten.	

▼M5

	Rotte	Mus
Dosering		
Indgiftsvej	Oral sonde eller subkutan injektion	
Indgiftsfrekvens	Én daglig dosis	
Volumen til sonde og injektion	≤ 5ml/kg kropsvægt (eller op til 10 ml/kg kropsvægt i tilfælde af vandige opløsninger) (på to injektionssteder for den subkutane vej)	
Indgiftens varighed	Tre på hinanden følgende dage for den ikkekønsmodne model Minimum tre på hinanden følgende dage for OVX-modellen	Syv på hinanden følgende dage for OVX-modellen
Obduktionstidspunkt	Ca. 24 timer efter sidste dosis	
Resultater		
Positiv respons	Statistisk signifikant stigning i den gennemsnitlige uterusvægt (våd- og/eller tørvægt)	
Referenceøstrogen	17α-ethinylestradiol	

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF RESULTATER

54. Generelt skal en test for østrogenicitet betragtes som positiv, hvis der er en statistisk signifikant stigning i uterusvægt ($p < 0,05$) i det mindste ved det høje dosisniveau sammenlignet med kontrolgruppen, der kun får opløsningsmiddel. Et positivt resultat understøttes yderligere af, at der påvises en biologisk plausibel sammenhæng mellem dosis og responsens størrelsesorden, idet man skal være opmærksom på, at testkemikaliets overlappende østrogene og antiøstrogene aktiviteter kan påvirke dosis-responskurvens form.

55. Man skal passe på ikke at overskride den maksimalt tolererede dosis for at sikre en meningsfuld fortolkning af data. Reduktion af kropsvægt, kliniske tegn og andre fund vurderes grundigt i den forbindelse.

56. En vigtig overvejelse ved godkendelse af data fra det uterotrofiske bioassay er uterusvægten hos vehikelkontrolgruppen. Høje kontrolværdier kan skade bioassayets responsivitet og evne til at detektere meget svage østrogenagonister. Litteraturgennemgang og data genereret under valideringen af det uterotrofiske bioassay tyder på, at tilfælde af høje kontrolgennemsnit faktisk forekommer spontant, især hos ikkekønsmodne dyr (2)(3)(6)(9). Da uterusvægten hos ikkekønsmodne rotter afhænger af mange variabler såsom stamme eller kropsvægt, kan der ikke sættes nogen endelig øvre grænse for uterusvægten. Som vejledning kan det siges, at hvis tørvægten af uterus hos ikkekønsmodne kontrolrotter ligger mellem 40 og 45 mg, skal resultaterne betragtes som mistænkelige, og en uterusvægt på over 45 mg kan betyde, at testen skal gennemføres igen. Dette skal dog overvejes i hvert enkelt tilfælde (3)(6)(8). Ved forsøg med voksne rotter vil en ufuldstændig ovariektomi efterlade ovarievæv, som kan producere endogent østrogen og forsinke nedgangen i uterusvægt.

▼**M5**

57. Vehikelkontrol med tørvægt af uterus under 0,09 % kropsvægt for ikkekønsmodne hunrotter og under 0,04 % for ovariektomiserede unge voksne hunner ser ud til at give acceptable resultater [se tabel 31 (2)]. Hvis kontroluterusvægten er større end disse tal, skal forskellige faktorer undersøges, bl.a. dyrenes alder, korrekt ovariektomi, fytoøstrogener i foderet osv., og et negativt assayresultat (ingen tegn på østrogen aktivitet) skal anvendes med forsigtighed.

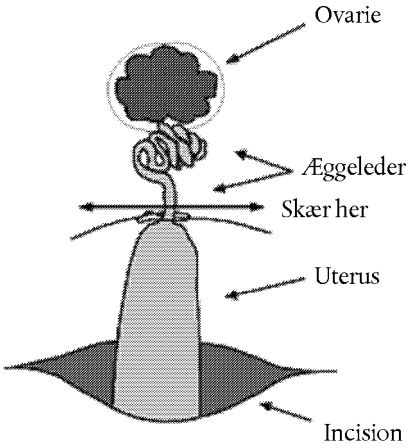
58. Tidligere data for vehikelkontrolgrupperne opbevares i laboratoriet. Tidligere data for reaktioner på positive referenceøstrogener såsom 17a-ethinylestradiol opbevares også på laboratoriet. Laboratorierne kan også teste responsen på kendte svage østrogenagonister. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) for at sikre, at laboratoriets metoder giver tilstrækkelig følsomhed.

59. Tørvægten af uterus viste mindre variabilitet i løbet af OECD's valideringsundersøgelse end vådvægten af uterus (6)(7). Imidlertid vil en signifikant respons i hver måling vise, at testkemikaliet er positivt over for østrogenaktivitet.

60. Den uterotrofiske respons skyldes ikke udelukkende østrogen, men et positivt resultat af bioassayet skal normalt fortolkes som bevis for østrogent potentiale in vivo og skal normalt give anledning til foranstaltninger med henblik på yderligere afklaring (se pkt. 9 og 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals', bilag 2).

Figur 1

Skematisk diagram, der viser den kirurgiske fjernelse af ovarier

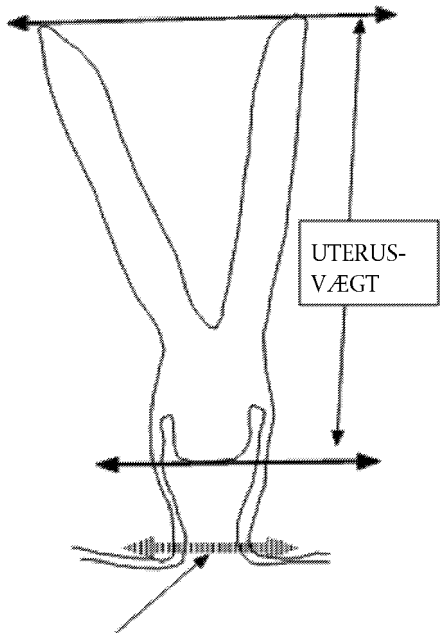


Proceduren begynder ved at åbne den dorsolaterale abdominalvæg ved midtpunktet mellem ribbenenes margo inferior og crista iliaca og nogle få millimeter lateralt i forhold til lændemusklens laterale kant. Ovarierne lokaliseres i bughulen. På et aseptisk felt fjernes ovarierne herefter fysisk fra bughulen, idet der lægges en ligatur mellem ovarie og uterus for at kontrollere blødning, og ovariet frigøres ved incision over ligaturen ved forbindelsespunktet mellem æggeleder og hvert livmoderhorn. Efter bekræftelse af, at der ikke forekommer væsentlig blødning, lukkes abdominalvæggen med sutur, og huden lukkes, f.eks. med autoclips eller sutur. Dyrene skal have mulighed for at komme sig, og uterusvægten for at gå ned i mindst 14 dage før brug.

▼**M5**

Figur 2

Fjernelse og præparering af uterusvæv til vægtmåling



Proceduren begynder ved at åbne abdominalvæggen ved skambenssymfysen. Herefter frigøres evt. ovarier samt livmoderhorn fra den dorsale abdominalvæg. Urinblære og urinledere fjernes fra den ventrale og laterale side af uterus og vagina. Fibrøs adhæsion mellem rektum og vagina frigøres, til forbindelsespunktet mellem vaginalåbning og perinealhud kan identificeres. Uterus og vagina frigøres fra kroppen ved foretage en incision i vaginalvæggen lige over forbindelsespunktet i perinealhuden som vist på figuren. Uterus frigøres fra kropsvæggen ved forsigtigt at skære det uterine mesenterium dorsolateralt ved tilhæftningspunktet i hele længden af hvert livmoderhorn. Efter fjernelse fra kroppen renses overskydende fedt og bindevæv væk. Evt. ovarier fjernes ved æggelederen, idet tab af luminalvæske fra livmoderhornet undgås. Såfremt dyret er blevet ovariektomiseret, undersøges ovariestilkene for tilstedeværelse af evt. ovarievæv. Vagina fjernes fra uterus lige under cervix, således at cervix forbliver sammen med corpus uteri som vist på figuren. Uterus kan herefter vejes.

▼M5

Tillæg 1

DEFINITIONER

Antiøstrogenicitet er et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af estradiol 17ß i et pattedyrs organisme.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Fødselsdato er dag 0 efter fødslen (PND).

Dosering er en generel term, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Dosis er mængden af indgivet testkemikalie. For det uterotrofiske bioassay udtrykkes dosis som vægt af et testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets kropsvægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag).

Maksimalt tolereret dosis (MTD) er den højeste mængde af et kemikalie, som ikke dræber forsøgsdyrene, når det indgives i kroppen (betegnes LD_0) (IUPAC, 1993).

Østrogenicitet er et kemikalies evne til at fungere som estradiol 17ß i et pattedyrs organisme.

Postnatal dag X er den X. levedag efter fødselsdagen (PND).

Følsomhed er andelen af alle positive/aktive kemikalier, som klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en testmetodes relevans.

Specificitet er andelen af alle negative/inaktive kemikalier, som klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en testmetodes relevans.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Uterotrofisk er en term, der bruges til at beskrive en positiv påvirkning af væksten af uterine væv.

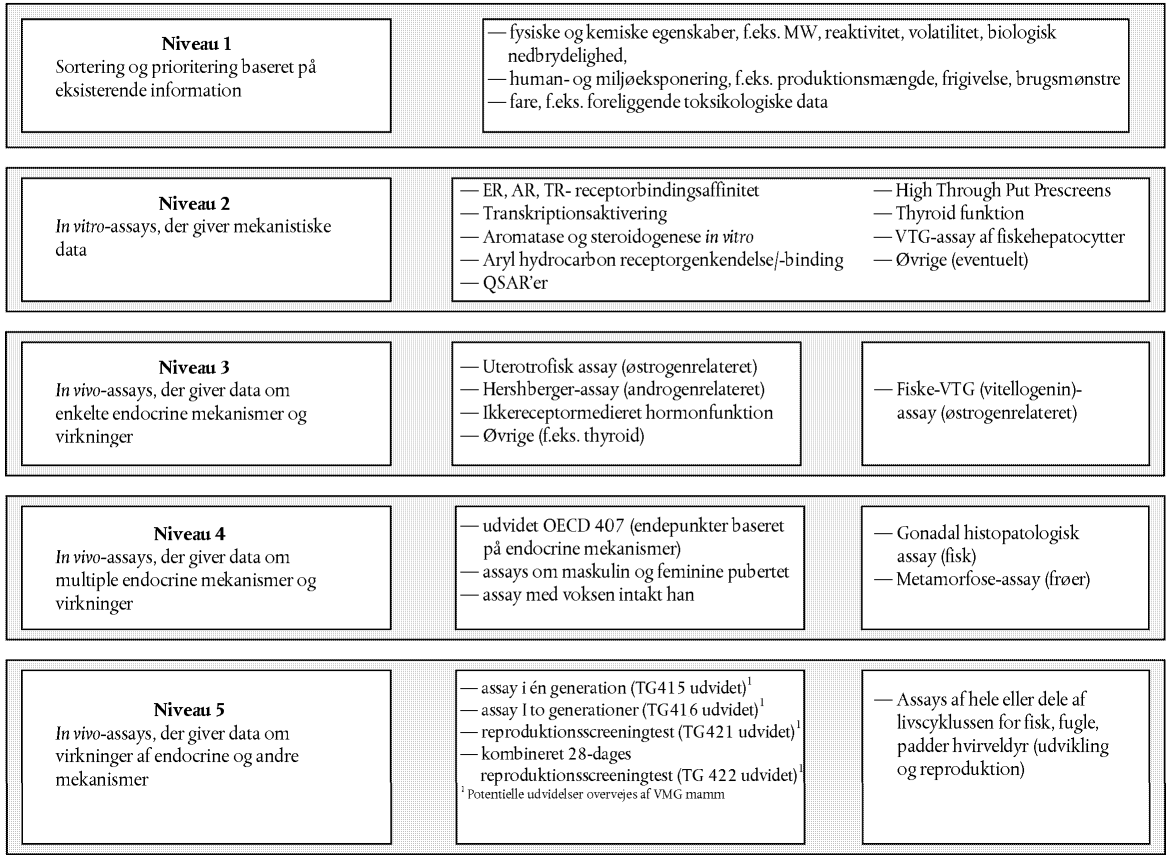
Validering er en videnskabelig proces til at karakterisere en testmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvise dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

▼M5

Tillæg 2

Note: Dokument udarbejdet af sekretariatet for testvejledningsprogrammet baseret på den aftale, der blev indgået på det sjette møde i EDTA-taskforcen

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 911

▼**M5**

NOTER TIL RAMMEN

Note 1: Det er muligt at gå ind og ud på alle niveauer; afhænger af arten af eksisterende informationsbehov med henblik på fare- og risikovurdering.

Note 2: På niveau 5 skal økotoksikologi omfatte endepunkter, der viser skadelige virkningsmekanismer og potential skade på befolkningen.

Note 3: Når en multimodal model dækker flere single endpoint assays, vil modellen erstatte brugen af de pågældende single endpoint assays.

Note 4: Vurderingen af hvert kemikalie skal ske i hvert enkelt tilfælde under inddragelse af al tilgængelig information og under hensyntagen til rammeniveauernes funktion.

Note 5: Rammen omfatter ikke alt på det givne tidspunkt. På niveau 3, 4 og 5 omfatter den assays, der enten er tilgængelige, eller hvor valideringen er på vej. Med hensyn til sidstnævnte er disse foreløbigt inkluderet. Når de er udviklet og valideret, vil de blive formelt tilføjet til rammen.

Note 6: Niveau 5 omfatter ikke kun endelige test. Test inkluderet på dét niveau bidrager til generel fare- og risikovurdering.

▼M5

LITTERATUR

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

2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549

8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.

9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985) The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec. 106:369-373.

▼M5

16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002) Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the kovarians changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol. 20:343-347.

22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596-601.

24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

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

26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320-333.

28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33-41.

29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288-305.

30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284-291.

31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

38) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

▼M5

B.55. **HERSHBERGER-TESTEN I ROTTER: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR (ANTI)ANDROGENE EGENSKABER**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 441 (2009). OECD indledte en højt prioriteret aktivitet i 1998 med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer (1). Et element i denne aktivitet var at udvikle en testvejledning for Hershberger-bioassayet med rotter. Dette assay blev først i 1962 standardiseret af et officielt ekspertudvalg som screeningværktøj for androgene kemikalier (2), efter at lægemiddelindustrien havde brugt det i flere årtier. I 2001-2007 gennemgik Hershberger-bioassayet med rotter et omfattende valideringsprogram, herunder udarbejdelse af et Background Review Document (23), udarbejdelse af et detaljeret dokument om metoder (3), udvikling af en dissektionsvejledning (21) og gennemførelse af omfattende intra- og interlaboratorieundersøgelser for at vise bioassayets pålidelighed og reproducerbarhed. Disse valideringsundersøgelser blev foretaget med et potent referenceandrogen (testosteron propionat (TP)), to potente syntetiske androgener (trenbolonacetat og methyltestosteron), et potent antiandrogent lægemiddel (flutamid), en potent syntesehæmmer (finasterid) af det naturlige androgen (dihydrotestosteron-DHT), flere ugentlige antiandrogene pesticider (linuron, vinclozolin, procymidon, p,p'DDE'), en potent 5α reduktasehæmmer (finasterid) og to kendte negative kemikalier (dinitrophenol og nonylphenol) (4) (5) (6) (7) (8). Denne testmetode er resultatet af de årelange erfaringer med bioassayet og erfaringerne fra valideringstestprogrammet og de der opnåede resultater.

2. Hershberger-bioassayet er en korttidsscreeningtest in vivo under anvendelse af sekundært væv fra hannens forplantningssystem. Assayet havde sin oprindelse i 1930'erne og blev ændret i 1940'erne, så det kom til at omfatte androgenresponsive muskler i hannens forplantningssystem (2) (9-15). I 1960'erne blev over 700 mulige androgener evalueret ved hjælp af en standardiseret version af protokollen (2) (14), og anvendelsen af assayet til både androgener og antiandrogener blev betragtet som en standardmetode i 1960'erne (2) (15). Det aktuelle bioassay er baseret på vægtændringerne i fem androgenafhængige væv hos den kastrerede peripubertære hanrotte. I bioassayet evalueres et kemikalies evne til at fremkalde biologiske virkninger i overensstemmelse med androgene agonister, antagonister eller 5α-reduktasehæmmere. De fem androgenafhængige målvæv, der er omfattet af denne testmetode, er ventral prostata (VP), vesiculae seminales (SV) (plus væsker og prostata anterior (coagulating glands)), levator ani-bulbocavernosus-musklen (LABC), parrede Cowpers kirtler (COW) og glans penis (GP). Hos kastrerede peripubertære hanrotter reagerer disse fem væv alle på androgener med en stigning i absolut vægt. Når de samme væv stimuleres til at øge vægten gennem indgift af et potent referenceandrogen, reagerer alle fem væv på antiandrogener med et fald i absolut vægt. Den primære model for Hershberger-bioassayet har været den kirurgisk kastrerede peripubertære han, som blev valideret i fase 1, 2 og 3 i Hershberger-valideringsprogrammet.

3. Hershberger-bioassayet fungerer som et mekanistisk in vivo-screeningassay for androgenagonister, androgenantagonister og 5a-reduktasehæmmere, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (tillæg 2). I denne konceptramme ligger Hershberger-bioassayet på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en enkelt endokrin mekanisme, nemlig (anti)androgenicitet. Det skal indgå i en række in vitro- og in vivo-test med henblik på at afdække kemikalier med potentiale til at interagere

▼M5

med det endokrine system, så man i sidste ende kan foretage vurderinger af farer og risici for menneskers sundhed og miljøet.

4. Af hensyn til dyrevelfærden i forbindelse med kastrationsproceduren ønskede man den intakte (ukastrerede), stimulerede og fravænnede han som en alternativ model til Hershberger-bioassayet for at undgå kastration. Testmetoden med stimulerede fravænnede dyr blev valideret (24). Ved valideringsundersøgelserne så udgaven af Hershberger-bioassayet med fravænnede dyr dog ikke ud til konsekvent at kunne detektere virkninger på androgenafhængige organers vægt af svage antiandrogener ved de testede doser. Derfor blev det ikke inkluderet i denne testmetode. I anerkendelse af at anvendelsen heraf ikke blot kan give fordele for dyrevelfærden, men også kan give information om andre virkningsmåder, er det tilgængeligt i OECD's vejledning 115 (25).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

5. Androgenagonister og -antagonister fungerer som ligander for androgenreceptoren og kan henholdsvis aktivere eller hæmme receptorkontrolleret gentranskription. Endvidere hæmmer nogle kemikalier omdannelsen af testosteron til mere potent naturlig androgen dihydrotestosteron i nogle androgene målvæv (5a-reduktasehæmmere). Disse kemikalier kan potentielt føre til sundhedsrisici, herunder skadevirkninger for reproduktion og udvikling. Derfor er der et lovgivningsmæssigt behov for hurtigt at vurdere og evaluere et kemikalie som en mulig androgenagonist eller -antagonist eller 5a-reduktasehæmmer. Selv om en ligands affinitet for en androgenreceptor som målt ved receptorbinding eller transkriptionsaktivering af reportergener in vitro er informativ, er det ikke den eneste determinant for mulig fare. Andre determinanter omfatter metabolisk aktivering og deaktivering ved optagelse i kroppen, kemikaliefordeling til målvæv og clearance fra kroppen. Dette skaber behov for at screene et kemikalies mulige aktivitet in vivo under relevante betingelser og relevant eksponering. In vivo-evaluering er mindre kritisk, hvis kemikaliets kendetegn med hensyn til absorption, distribution, metabolisme og eliminering (ADME) er kendt. Androgenafhængige væv reagerer med hurtig og kraftig vækst på stimulering med androgener, især hos kastrerede peripubertære hanrotter. Gnaverarter, navnlig rotten, anvendes også bredt i toksicitetsundersøgelser til risikobeskrivelse. Derfor er den assayversion, som anvender kastrerede peripubertære rotter og de fem målvæv i dette assay, egnet til in vivo-screening af androgenagonister og -antagonister og 5a-reduktasehæmmere.

6. Denne testmetode er baseret på de protokoller, der blev anvendt i OECD's valideringsundersøgelse, og som har vist sig at være pålidelige og repeterbare i intra- og interlaboratorieundersøgelser (4) (5) (6) (7) (8). Både androgene og antiandrogene procedurer præsenteres i denne testmetode.

7. Selv om der var en vis variation i den TP-dose, de forskellige laboratorier brugte til at detektere antiandrogener i OECD's valideringsprogram for Hershberger-bioassay (0,2 mod 0,4 mg/kg/dag, subkutan injektion), var der kun en lille forskel mellem disse to protokolvariationer i evnen til at detektere svag eller stærk antiandrogen aktivitet. Det er dog klart, at TP-dosen ikke skal være så høj, at den blokerer virkningerne af svage androgenreceptorantagonister (AR), eller så lav, at de androgene væv kun udviser en lille vækstrespons selv uden samtidig indgift af antiandrogen.

▼M5

8. Vækstresponsen i de enkelte androgenafhængige væv skyldes ikke udelukkende androgen, hvilket vil sige, at andre kemikalier end androgenagonister kan ændre vægten af visse væv. Dog underbygger vækstresponsen i flere væv samtidig en mere androgenspecifik mekanisme. F.eks. kan høje doser af potent østrogen øge vægten af vesiculae seminales. Dog reagerer de øvrige androgenafhængige væv i assayet ikke på samme måde. Antiandrogene kemikalier kan fungere som enten androgenreceptorantagonister eller 5a-reduktasehæmmere. 5a-reduktasehæmmere har variabel virkning, fordi omdannelsen til mere potent dihydrotestosteron varierer efter væv. Antiandrogener, som hæmmer 5α-reduktase, såsom finasterid har mere udtalte virkninger i ventral prostata end andre væv sammenlignet med en potent AR-antagonist som flutamid. Denne forskel i vævsrespons kan bruges til at differentiere mellem AR-medierede og 5α-reduktasemedierede virkningsmåder. Desuden hænger den androgene receptor udviklingsmæssigt sammen med andre steroidhormoner, og visse andre hormoner kan — når de indgives ved høje suprafysiologiske doseringsniveauer — binde og antagonisere de vækstfremmende virkninger af TP (13). Endvidere er det også plausibelt, at styrket steroidmetabolisme og en konsekvent sænkning af serumtestosteron kan reducere androgenafhængig vævsvækst. Derfor skal et positivt udfald i Hershberger-bioassayet normalt evalueres efter en såkaldt 'weight of evidence'-tilgang, bl.a. in vitro-assays, f.eks. assays om AR- og østrogenreceptorbinding (ER) og tilsvarende assays om transkriptionsaktivering eller andre in vivo-assays, der undersøger lignende androgene målvæv, såsom assayet om hannens pubertet, 15-dages assay af voksen han eller 28- eller 90-dagesundersøgelser med gentagen dosis.

9. Erfaringerne viser, at xenobiotiske androgener er sjældnere end xenobiotiske antiandrogener. Forventningen er, at Hershberger-bioassayet oftest vil blive anvendt til screening af antiandrogener. Imidlertid kan proceduren for at teste for androgener ikke desto mindre anbefales for steroide eller steroidlignende kemikalier eller for kemikalier, for hvilke et tegn på mulige androgene virkninger blev afledt af metoder indeholdt i konceptrammens niveau 1 eller 2 (tillæg 2). På samme måde kan der observeres skadevirkninger i forbindelse med (anti)androgene profiler i niveau 5-assays, hvilket skaber behov for at vurdere, om et kemikalie har en endokrin virkningsmåde.

10. Det er anerkendt, at alle dyrebaserede procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af dyr. Nedenstående beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (26). OECD har udarbejdet yderligere vejledning om human behandling af dyr (17).

11. Som i ethvert bioassay, hvor der benyttes forsøgsdyr, skal det nøje overvejes, om det er nødvendigt at udføre den pågældende undersøgelse. Grundlæggende kan der være to grunde til en sådan beslutning:

— højt eksponeringspotentiale (niveau 1 i konceptrammen) eller tegn på (anti)androgenicitet i in vitro-assays (niveau 2) til støtte for undersøgelser af, om sådanne virkninger kan optræde in vivo

— virkninger i overensstemmelse med (anti)androgenicitet i in vivo-test på niveau 4 eller 5 til støtte for undersøgelser af den specifikke virkningsmåde, f.eks. for at fastslå, om virkningerne skyldtes en (anti)androgen mekanisme.

▼M5

12. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

13. Hershberger-bioassayet opnår sin følsomhed ved at anvende hanner med en minimal endogen androgenproduktion. Dette opnås ved at anvende kastrerede hanner, forudsat at der gives en passende tid efter kastration, så målvævene kan vende tilbage til en minimal og ensartet basislinjevægt. Ved screening af potentiel androgen aktivitet er der således lave endogene niveauer af cirkulerende androgener, HPG-aksen (hypotalamus-hypofyse-gonade) gøres ude af stand til at kompensere via feedbackmekanismer, vævenes evne til at reagere maksimeres, og variabiliteten i vævets udgangsvægt minimeres. Ved screening af potentiel antiandrogen aktivitet kan der opnås en mere konsistent vævsvægtforøgelse, når vævene stimuleres af et referenceandrogen. Som følge heraf kræver Hershberger-bioassayet kun seks dyr pr. dosisgruppe, mens det til andre assays med intakte pubertære eller voksne hanner foreslås at anvende 15 hanner pr. dosisgruppe.

14. Peripubertære hanner kastreres på passende vis under anvendelse af godkendte bedøvelsesmidler og aseptisk teknik. Smertestillende midler indgives i de første dage efter operation for at fjerne gener efter indgrebet. Kastration øger assayets præcision med hensyn til at detektere svage androgener og antiandrogener ved at fjerne kompenserende endokrine feedbackmekanismer, som er til stede i det intakte dyr, og som kan mildne virkningerne af indgivne androgener og antiandrogener, og ved at fjerne den store variation i serumtestosteronniveauer mellem individerne. Derfor mindsker kastration antallet af dyr, som det er nødvendigt at screene for disse endokrine aktiviteter.

15. Ved screening for potentiel androgen aktivitet indgives testkemikaliet dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion i en periode på 10 på hinanden følgende dage. Testkemikalier indgives til minimum to behandlingsgrupper af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. En statistisk signifikant stigning i vægten af to eller flere målorganer hos testkemikaliegrupperne sammenlignet med vehikelkontrolgruppen viser, at testkemikaliet er positivt for potentiel androgen aktivitet (se pkt. 60). Androgener som trenbolon, der ikke kan være 5α-reduceret, har mere udtalte virkninger på LABC og GP over for TP, men alle væv skal udvise øget vægt.

16. Ved screening for potentiel antiandrogen aktivitet indgives testkemikaliet dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion i en periode på 10 på hinanden følgende dage sammen med daglige TP-doser (0,2 eller 0,4 mg/kg/dag) ved subkutan injektion. Det blev fastslået i valideringsprogrammet, at enten 0,2 eller 0,4 mg TP/kg/dag kunne bruges, da begge var effektive til detektion af antiandrogener, og derfor skal kun én dosis vælges til brug i assayet. Graduerede testkemikaliedoser indgives til minimum tre behandlingsgrupper af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. Et statistisk signifikant fald i vægten af to eller flere målorganer hos de grupper, der får testkemikaliet plus TP, sammenlignet med kontrolgruppen, der kun får TP, viser, at testkemikaliet er positivt for potentiel antiandrogen aktivitet (se pkt. 61).

▼M5

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af art og stamme

17. Rotten er rutinemæssigt blevet anvendt i Hershberger-bioassays siden 1930'erne. Skønt det er biologisk plausibelt, at både rotter og mus vil udvise de samme reaktioner, er rotter den foretrukne art til Hershberger-bioassayet på grundlag af 70 års erfaring med rottemodellen. Da Hershberger-bioassaydata desuden måske er foreløbige forud for en langtidsundersøgelse af flere generationer, giver det mulighed for, at dyr fra den samme art, stamme og kilde kan anvendes i begge undersøgelser.

18. Denne protokol giver laboratorier mulighed for at udvælge den rottestamme, der skal anvendes i assayet, og som normalt skal være den, det deltagende laboratorium tidligere har brugt. Almindeligt anvendte forsøgsrottestammer kan anvendes. Dog skal stammer, der bliver kønsmodne betydeligt senere end ved 42-dages alderen, ikke anvendes, da kastration af disse hanner, når de er 42 dage, kan udelukke måling af vægten af glans penis, hvilket først kan ske, efter at forhuden er adskilt fra penisskaftet. Således bør stammer afledt af Fisher 344-rotten kun anvendes i sjældne tilfælde. Fisher 344-rotten bliver kønsmoden på et andet tidspunkt end andre mere almindeligt anvendte stammer såsom Sprague Dawley- eller Wistar-stammerne (16). Skal en sådan stamme anvendes, skal laboratoriet kastrere dem, når de er lidt ældre, og påvise den anvendte stammes følsomhed. Rationalet bag valget af rottestamme skal klart angives af laboratoriet. Hvis screeningassayet kan gennemføres som en forundersøgelse til en undersøgelse med gentagen oral dosis, en reproduktions- og udviklingsundersøgelse eller en langtidsundersøgelse, skal der helst bruges dyr fra samme stamme og kilde i alle undersøgelser.

Miljøbetingelser og fodring

19. Alle procedurer skal overholde alle lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Disse beskrivelser af pasning og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af strengere lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (26). Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke.

20. På grund af dyrenes unge alder og den kendsgerning, at rotter er sociale dyr, foretrækkes gruppeanbringelse frem for isolering. Når man anbringer to eller tre dyr pr. bur, undgår man sammenklumpning og dermed forbundet stress, som kan forstyrre den hormonale kontrol med udviklingen af sekundært kønsvæv. Burene renses grundigt for at fjerne mulige forurenende stoffer og anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Bure af korrekt størrelse (~ 2 000 cm^2) vil forhindre sammenklumpning.

21. Hvert dyr identificeres individuelt (f.eks. øremærke eller tag) under anvendelse af en human metode. Identifikationsmetoden registreres.

▼M5

22. Laboratoriefoder og drikkevand gives ad libitum. Laboratorier, der udfører Hershberger-bioassays, skal bruge det laboratoriefoder, som normalt bruges i deres kemiske testarbejde. I valideringsundersøgelserne af bioassayet blev der ikke observeret virkninger eller variabilitet, som skyldtes kosten. Foderet registreres normalt, og en prøve på laboratoriefoderet opbevares til evt. fremtidig analyse.

Resultatkrav til androgenafhængig organvægt

23. Under valideringsundersøgelsen var der intet bevis for, at et fald i kropsvægt påvirkede stigninger eller fald i væksten i målvævenes vægt (dvs. væv, som skulle vejes i den pågældende undersøgelse).

24. Blandt de forskellige rottestammer, som med held blev anvendt i valideringsprogrammet, er den androgenafhængige organvægt større hos de tungere rottestammer end hos de lettere. Derfor omfatter resultatkravene til Hershberger-bioassayet ikke absolut forventede organvægtværdier for positive og negative kontroller.

25. Fordi variationskoefficienten for et væv har en omvendt sammenhæng med statistisk opløsningsgrad, er ydeevnekriterierne for Hershberger-bioassayet baseret på maksimale variationskoefficienter for hvert væv (tabel 1). Variationskoefficienterne er afledt af OECD's valideringsundersøgelser. I tilfælde af negative resultater undersøger laboratorierne variationskoefficienterne fra kontrolgruppen og højdosisbehandlingsgruppen for at fastslå, om performance-kriteriet om maksimal variationskoefficient er overskredet.

26. Undersøgelsen gentages, når: 1) tre eller flere af de 10 mulige individuelle variationskoefficienter i kontrol- og højdosisbehandlingsgrupperne overskrider de fastsatte maksimumsværdier for agonist- og antagonistundersøgelser i tabel 1, og 2) mindst to målvæv var marginalt ubetydelige, dvs. r-værdier mellem 0,05 og 0,10.

Tabel 1

Maksimalt tilladelige variationskoefficienter bestemt for sekundære målkønsvæv for kastratmodellen i OECD's valideringsundersøgelser [1]**.**

Væv	Antiandrogene virkninger	Androgene virkninger
Vesiculae seminales	40 %	40 %
Ventral prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowpers kirtler	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

[1] Tærskelvariationskoefficienten for et givet væv blev identificeret fra en graf af variationskoefficientværdier — anført fra sekventielt mindste til største — for alle gennemsnit fra alle forsøg i valideringsundersøgelsen under anvendelse af en bestemt model (agonist eller antagonist). Tærskelvariationskoefficienten blev læst fra det punkt, hvor intervallerne mellem de næsthøjeste variationskoefficienter i serien er dramatisk større end de foregående få variationskoefficienter — »brudpunktet«. Det skal bemærkes, at skønt denne analyse identificerede relativt pålidelige »brudpunkter« for assayets antagonistmodel, viste variationskoefficientkurver for agonistassayet en mere ensartet stigning, hvilket gør identificeringen af en tærskelvariationskoefficient noget tilfældig efter denne metode.

▼M5

FREMGANGSMÅDE

Overholdelse af lovgivning og laboratoriekontrol

27. I modsætning til det uterotrofiske assay (kapitel B.54 i dette bilag) er en påvisning af laboratoriets kompetence før iværksættelse af undersøgelsen ikke nødvendig ved Hershberger-assayet, fordi der som en integreret del af assayet samtidig foretages positive (testosteronpropionat og flutamid) og negative kontroller.

Dyrenes antal og vilkår

28. Hver test- og kontrolgruppe skal omfatte minimum seks dyr. Dette gælder for både androgene og antiandrogene protokoller.

Kastration

29. Der skal være en indledende akklimatiseringsperiode på flere dage efter modtagelse af dyrene for at sikre, at dyrene er sunde og trives. Da dyr, som er kastreret, før de er 42 dage gamle eller før PND 42, måske ikke viser tegn på præputial separation, skal dyrene kastreres på PND 42 eller senere, ikke før. Dyrene kastreres under bedøvelse ved at lægge et indsnit i scrotum og fjerne både testes og epididymides med ligering af blodkar og sædgange. Efter bekræftelse af, at der ikke er opstået blødning, lukkes scrotum med sutur eller autoclips. Dyrene behandles med smertestillende midler i de første par dage efter operationen for at mildne evt. gener efter indgrebet. Købes kastrerede dyr fra en dyreleverandør, skal leverandøren garantere dyrenes alder og status for kønsmodning.

Akklimatisering efter kastration

30. Dyrene fortsætter akklimatiseringen til laboratorieforholdene for at give vægten af målvævet tid til at falde i mindst syv dage efter kastration. Dyrene observeres dagligt, og dyr med tegn på sygdom eller fysiske abnormiteter fjernes. Således kan behandling med iværksættelse af dosering (som undersøges) påbegyndes allerede på PND 49, men senest på PND 60. Alderen ved obduktion bør ikke være mere end PND 70. Denne fleksibilitet giver et laboratorium mulighed for at planlægge forsøgsarbejdet effektivt.

Kropsvægt og grupperandomisering

31. Forskellene i individuel kropsvægt er en kilde til variabilitet i vævsvægt både inden for og imellem grupper af dyr. Stigende variabilitet i vævsvægt resulterer i en øget variationskoefficient og nedsætter assayets statistiske styrke (undertiden omtalt som assayets følsomhed). Derfor kontrolleres variationer i kropsvægt både eksperimentelt og statistisk.

32. Eksperimentel kontrol betyder, at der produceres små variationer i kropsvægt i og mellem undersøgelsesgrupperne. For det første må usædvanligt små eller store dyr undgås og må ikke placeres i en undersøgelseskohorte. Ved undersøgelsens start bør dyrenes vægtvariation ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten (f.eks. 175 g ± 35 g for kastrerede peripubertære rotter). For det andet tilordnes dyr til grupper (kontrol- og behandlingsgrupper) ved randomiseret vægtfordeling, således at hver gruppes gennemsnitlige kropsvægt ikke er statistisk forskellig fra en anden gruppes. Den anvendte blokrandomiseringsprocedure registreres.

▼M5

33. Da toksicitet kan nedsætte de behandlede gruppers kropsvægt i forhold til kontrolgruppens, kan kropsvægten på den første dags indgift af testkemikaliet bruges som statistisk kovarians, ikke kropsvægten ved obduktion.

Dosering

34. Til at fastslå, om et testkemikalie kan have androgen virkning in vivo, er to dosisgrupper for testkemikaliet plus positive og vehikel- (negative) kontrolgrupper (se pkt. 43) normalt tilstrækkelige, og dette design foretrækkes derfor af hensyn til dyrevelfærden. Hvis formålet er enten at opnå en dosis-responskurve eller at ekstrapolere til lavere doser, er der behov for mindst tre dosisgrupper. Hvis der kræves information ud over identificeringen af androgen aktivitet (såsom et skøn over styrke), må man overveje et andet dosisregime. For at teste for antiandrogener indgives testkemikaliet sammen med en referenceandrogenagonist. Der skal således bruges mindst tre testgrupper med forskellige doser af testkemikaliet og en positiv og en negativ kontrolgruppe (se pkt. 44). Med undtagelse af behandling med testkemikaliet behandles dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et vehikel til indgift af testkemikaliet, skal kontrolgruppen modtage vehiklet i den højeste mængde, der bruges til testgrupperne.

35. Alle dosisniveauer foreslås og vælges under hensyntagen til evt. eksisterende toksicitets- og (toksiko-)kinetiske data om testkemikaliet eller materiale i den forbindelse. Ved det højeste dosisniveau tages der for det første hensyn til LD_{50} og/eller information om akut toksicitet for at undgå død, alvorlig lidelse eller gener for dyrene (17) (18) (19) (20) og for det andet til tilgængelige oplysninger om doser anvendt i subkroniske og kroniske undersøgelser. Generelt må den højeste dosis ikke forårsage en reduktion i dyrenes endelige kropsvægt på mere end 10 % af kontrolvægten. Den højeste dosis skal være enten 1) den højeste dosis, som sikrer dyrets overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller gener for dyrene efter 10 på hinanden følgende dages indgift af op til en maksimal dosis på 1 000 mg/kg/dag (se pkt. 36), eller 2) en dosis, der fremkalder (anti)androgene virkninger, alt efter hvilken der er lavest. Til screening er store intervaller, f.eks. enheder a en halv logaritme (svarende til en dosisprogression på 3,2) eller enheder a en logaritme mellem doseringerne, acceptable. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres en range-finding-undersøgelse (se pkt. 37) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.

Grænsedosis

36. Såfremt en test med en grænsedosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag og en lavere dosis ved anvendelse af procedurerne for denne undersøgelse ikke fremkalder en statistisk signifikant ændring i kønsorganernes vægt, kan supplerende dosisniveauer anses for unødvendige. Grænsedosis gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

Overvejelser over 'range-finding'

37. Om nødvendigt kan der udføres en foreløbig range-finding-undersøgelse med fem dyr for at vælge de egnede dosisgrupper [ved hjælp af metoder til bestemmelse af akut giftighed (kapitel B.1.A, B.1.B i dette bilag (27), OECD-testvejledning 425 (19))]. Formålet med Hershberger-bioassayet er at vælge doser, der sikrer dyrenes overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller gener for dyrene efter 10 på hinanden følgende dages indgift af kemikaliet indtil en grænsedosis på 1 000 mg/kg/dag som anført i pkt. 35 og 36. I den forbindelse kan OECD's vejledning (17) bruges til at definere kliniske tegn på toksicitet eller lidelse for dyrene. Såfremt det er muligt inden for denne range-finding-undersøgelse, kan

▼M5

målvævene eksciseres efter 10 dages indgift og vejes ca. 24 timer efter indgift af den sidste dosis. Disse data kan herefter bruges som input til valg af doser i hovedundersøgelsen.

Referencekemikalier og vehikel

38. Referenceandrogenagonisten skal være testosteronpropionat (TP), CAS-nr. 57-82-5. Reference-TP-doseringen kan være enten 0,2 mg/kg kropsvægt/dag eller 0,4 mg/kg kropsvægt/dag. Referenceandrogenantagonisten skal være flutamid (FT), CAS-nr. 1311-84-7. Reference-FT-doseringen skal være 3 mg/kg kropsvægt/dag, og FT indgives sammen med reference-TP-doseringen.

39. Det anbefales først at overveje en vandig opløsning/suspension, hvor det er muligt. Da mange androgene ligander eller deres metaboliske prækursorer imidlertid normalt er hydrofobe, er den mest almindelige fremgangsmåde at anvende en opløsning/suspension i olie (f.eks. majs-, jordnødde-, sesam- eller olivenolie). Testkemikalier kan opløses i en minimal mængde på 95 % ethanol eller andre egnede opløsningsmidler og fortyndes til endelige arbejdskoncentrationer i testvehiklet. Opløsningsmidlets toksiske karakteristika skal være kendt og bør testes i en særskilt kontrolgruppe, som kun får opløsningsmiddel. Hvis testkemikaliet anses for stabilt, kan svag opvarmning og kraftig mekanisk påvirkning bruges til at fremme opløsningen af testkemikaliet. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Er testkemikaliet stabilt, mens undersøgelsen står på, kan en startalikvot af testkemikaliet tilberedes, og de angivne fortyndinger af dosis tilberedes dagligt, idet man må passe på, at prøverne ikke kontamineres og ødelægges.

Indgift af doser

40. TP indgives ved subkutan injektion og FT i oral sonde.

41. Testkemikaliet indgives ved oral sonde eller subkutan injektion. Dyrevelfærdshensyn og testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber tages i betragtning ved valg af indgiftsvej. Endvidere skal der tages hensyn til toksikologiske aspekter såsom relevansen af menneskers vej til eksponering for kemikaliet (f.eks. oral sonde over for modelindtagelse, subkutan injektion over for modelinhalation eller hudadsorption) og eksisterende toksikologisk information og data om metabolisme og kinetik (f.eks. behov for at undgå førstepassage-metabolisme, bedre effektivitet via en bestemt vej), før der iværksættes omfattende langtidstest, hvis der opnås positive resultater ved injektion.

42. Dyrene doseres på samme måde og med samme tidsinterval i 10 dage i træk med ca. 24 timers intervaller. Dosisniveauet justeres dagligt på grundlag af de samtidige daglige målinger af kropsvægt. Dosisvolumen og indgiftstidspunkt registreres på hver eksponeringsdag. Man skal passe på ikke at overskride den maksimale dosis, jf. pkt. 35, for at sikre en meningsfuld datafortolkning. Reduktion af kropsvægt, kliniske tegn og andre fund vurderes grundigt i den forbindelse. Ved oral sondefodring anvendes en mavesonde eller en passende intubationskanyle. Hvor stor en væskemængde, der kan

▼M5

indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Lokale retningslinjer for pleje af dyr skal følges, men mængden bør ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt. Ved subkutane injektioner indgives doserne i de dorsoskapulære og lumbale regioner ved hjælp af en steril nål (f.eks. kaliber 23 eller 25) og en tuberkulinsprøjte. Det er valgfrit, om injektionsområdet barberes. Evt. tab eller lækage på injektionsstedet eller ufuldstændig dosering registreres. Det samlede injicerede volumen pr. rotte pr. dag må ikke overstige 0,5 ml/kg kropsvægt.

Særlige procedurer for androgenagonister

43. Til testen for androgenagonister er vehiklet den negative kontrol, og den TP-behandlede gruppe er den positive kontrol. Biologisk aktivitet i overensstemmelse med androgenagonister testes ved at give behandlingsgrupperne et testkemikalie i de valgte doser i 10 dage i træk. Vægten af de fem sekundære kønsvæv fra testkemikaliegrupperne sammenlignes med vehikelgruppen for statistisk signifikante vægtstigninger.

Særlige procedurer for androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere

44. Til testen for androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere er den TP-behandlede gruppe den negative kontrol, og gruppen, der samtidig har fået referencedoser af TP og FT, er den positive kontrolgruppe. Biologisk aktivitet i overensstemmelse med androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere testes ved at indgive en referencedosis TP og testkemikaliet i 10 dage i træk. Vægten af de fem sekundære kønsvæv fra TP-plus-testkemikaliegrupperne sammenlignes med den gruppe, der kun har fået reference-TP, for statistisk signifikante vægtstigninger.

OBSERVATIONER

Kliniske observationer

45. Generelle kliniske observationer foretages mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationer skal helst udføres på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til perioden for den forventede maksimale virkning efter dosering. Alle dyr observeres for mortalitet, morbiditet og generelle kliniske tegn såsom ændringer i adfærd, hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster).

46. Et dyr, som findes død, fjernes og bortskaffes uden yderligere dataanalyse. Et dyrs mortalitet før obduktion registreres i undersøgelsesrapporten sammen med evt. umiddelbare dødsårsager. Et moribund dyr aflives humant. Moribunde og efterfølgende aflivede dyr registreres i undersøgelsesrapporten med umiddelbare morbiditetsårsager.

▼M5

Kropsvægt og foderindtagelse

47. Alle dyr vejes dagligt til nærmeste 0,1 g begyndende lige før indledningen af behandlingen, dvs. når dyrene fordeles i grupper. Som valgfri måling kan mængden af indtaget foder i behandlingsperioden måles pr. bur ved at veje fodringssystemerne. Resultaterne for foderindtagelsen udtrykkes i gram pr. rotte pr. dag.

Dissektion og måling af vævs- og organvægt

48. Ca. 24 timer efter den sidste indgift af testkemikaliet aflives rotterne og afblødes ifølge de normale procedurer for det laboratorium, som forestår undersøgelsen, og obduktionen udføres. Den humane aflivningsmetode registreres i laboratorierapporten.

49. Ideelt set skal obduktionsrækkefølgen være vilkårlig på tværs af grupper for at undgå progression direkte op eller ned i forhold til dosisgrupper, som kan påvirke dataene. Evt. fund ved obduktionen, dvs. patologiske ændringer/synlige læsioner, noteres og rapporteres.

50. De fem androgenafhængige væv (VP, SV, LABC, COW, GP) vejes. Disse væv udtages, renses omhyggeligt for overskydende bindevæv og fedt, og deres friske (ufikserede) vægt bestemmes. Hvert væv håndteres med særlig omhu for at undgå tab af væsker og udtørring, som kan give betydelige fejl og variabilitet ved at nedsætte den registrerede vægt. Flere af vævene kan være meget små eller vanskelige at dissekere, hvilket vil skabe variabilitet. Derfor er det vigtigt, at personer, der udfører dissektion af sekundære kønsvæv, kender standardprocedurerne for dissektion af disse væv. OECD har udgivet en manual for standardoperationsprocedurer (SOP) ved dissektion (21). Omhyggelig træning efter SOP-vejledningen vil minimere en potentiel kilde til variation i undersøgelsen. Ideelt set skal den samme prosektor være ansvarlig for dissektion af et givet væv for at fjerne individuelle forskelle i vævsbehandling. Hvis dette ikke er muligt, udformes obduktionen således, at hver prosektor dissekerer et givet væv fra alle behandlingsgrupper i modsætning til, at én person dissekerer alle væv fra en kontrolgruppe, mens en anden er ansvarlig for behandlingsgrupperne. Hvert sekundært kønsvæv vejes uden aftørring til nærmeste 0,1 mg, og vægtværdierne registreres for hvert dyr.

51. Flere af vævene kan være meget små eller vanskelige at dissekere, hvilket vil skabe variabilitet. Tidligere arbejde har vist en række variationskoefficienter, som ser ud til at afvige på grund af laboratoriets kompetence. I nogle få tilfælde er der konstateret store forskelle i absolut vævsvægt såsom VP og COW hos et bestemt laboratorium.

52. Vægt af lever, parrede nyrer og parrede binyrer er valgfrie målinger. Igen skal væv være renset for bindevævshinder og fedt. Leveren vejes og registreres til nærmeste 0,1 g, og de parrede nyrer og binyrer vejes og registreres til nærmeste 0,1 mg. Lever, nyrer og binyrer påvirkes ikke blot af androgener, de giver også nyttige indekser for systemisk toksicitet.

▼**M5**

53. Serummåling af luteiniserende hormon (LH), follikelstimulerende hormon (FSH) og testosteron (T) er valgfri. Serum-T-niveauer er nyttige til at fastslå, om testkemikaliet fremkalder levermetabolisme af testosteron og sænker serumniveauer. Uden T-data kunne en sådan virkning se ud til at ske via en antiandrogen mekanisme. LH-niveauer giver information om et antiandrogens evne til ikke blot at reducere organvægt, men også til at påvirke hypothalamus-hypofyse-funktionen, hvilket i langtidsundersøgelser kan fremkalde testistumorer FSH er et vigtigt hormon for spermatogenesen. Serum T4 og T3 er også valgfrie målinger, der giver nyttig supplerende information om evnen til at forstyrre thyroidehormonbalancen. Såfremt hormonmålingerne skal foretages, bedøves rotterne forud for obduktion, og blod udtages ved hjertepunktur, og bedøvelsesmetoden vælges omhyggeligt, således at den ikke påvirker hormonmålingen. Serumtilberedningsmetoden, kilden til radioimmunanalyse eller andet måleudstyr, analytiske procedurer samt resultater registreres. LH-niveauer anføres som ng pr. ml serum, og T anføres også som ng pr. ml serum.

54. Dissektionen af væv beskrives som følger, idet der er udgivet en detaljeret dissektionsvejledning med fotografier som supplerende materiale som led i valideringsprogrammet (21). En dissektionsvideo er også tilgængelig fra den koreanske fødevare- og lægemiddelstyrelses hjemmeside (22).

— Med dyrets ventrale overflade opad fastslås, om penis' forhud er adskilt fra glans penis. I bekræftende fald trækkes forhuden tilbage, og glans penis fjernes, vejes (nærmeste 0,1 mg), og vægten registreres.

— Åbn abdominalhud og -væg, så viscera ligger blottede. Såfremt de valgfrie organer vejes, fjernes og vejes leveren til nærmeste 0,1 g, mave og indvolde fjernes, de parrede nyrer og binyrer fjernes og vejes til nærmeste 0,1 mg. Ved denne dissektion eksponeres blæren, og dissektionen af hannens sekundære målvæv påbegyndes.

— VP dissekeres ved at adskille blæren fra det ventrale muskellag, idet bindevævet skæres langs midterlinjen. Fjern blæren fortil imod vesiculae seminales (SV), så venstre og højre prostatalap blotlægges ventralt (dækket af et lag fedt). Adskil omhyggeligt fedtet fra højre og venstre VP-lap. Fjern forsigtigt højre VP-lap fra uretra, og disseker uretralappen. Hold fast i højre VP-lap, og fjern forsigtigt venstre VP-lap fra uretra, og disseker. Vej til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

— For at dissekere vesiculae seminales med prostata anterior (SVGC) fjernes blæren bagtil, så vas deferens og højre og venstre lap af vesiculae seminales med prostata anterior (SVCG) blotlægges. Forebyg væskelækage ved hjælp af en karklemme ved grunden af SVCG'erne, hvor vas deferens hæfter på uretra. Disseker omhyggeligt SVCG'erne med karklemmen på plads, rens for fedt og adneksa, placer i et tareret vejekar, fjern karklemmen, vej til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

▼M5

— For at dissekere levator ani-bulbocavernosus-musklerne (LABC) blotlægges musklerne og penis' basis. LA-musklerne vikler sig omkring colon, mens LA anterior og BC-musklerne hæfter på bulbus penis. Hud og adneksa fra det perianale område, der strækker sig fra penis' basis til den forreste del af anus, fjernes. BC-musklerne dissekeres gradvist fra bulbus penis og væv. Colon skæres i to, og hele LABC kan dissekeres og fjernes. LABC renses for fedt og adneksa, vejes til nærmeste 0,1 mg, og vægten registreres.

— Efter fjernelse af LABC er de runde Cowpers (COW) eller bulbouretrale kirtler synlige ved basis af og lidt dorsalt i forhold til bulbus penis. For at forhindre væskelækage er omhyggelig dissektion påkrævet for at undgå at ramme den tynde kapsel. Vej de parrede COW til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

— Hvis der tabes væske fra en kirtel under obduktion og dissektion, skal det registreres.

55. Hvis vurderingen af hvert kemikalie kræver obduktion af flere dyr, end det er rimeligt for en enkelt dag, kan undersøgelsens start forskydes over to på hinanden følgende dage, hvilket fører til forskydning af obduktion og arbejdet i den forbindelse over to dage. Foretages en sådan forskydning, anvendes halvdelen af dyrene pr. behandlingsgruppe pr. dag.

56. Kadavere bortskaffes på passende vis efter obduktion.

RAPPORTERING

Data

57. Data rapporteres individuelt (dvs. kropsvægt, vægt af sekundære kønsvæv, valgfrie målinger og andre reaktioner og observationer) og for hver gruppe af dyr (gennemsnit og standardafvigelser for alle målingerne). Data opsummeres i tabelform. Dataene skal vise antallet af dyr ved testens begyndelse, antallet af dyr, som blev fundet døde under testen eller fundet med tegn på toksicitet, en beskrivelse af de observerede tegn på toksicitet, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhedsgrad.

58. Den endelige rapport skal indeholde:

Testlaboratorium

— laboratoriets navn, placering

— forsøgsleder og andre medarbejdere og deres undersøgelsesansvar

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning, dvs. henholdsvis første dag for indgift af testkemikaliet og sidste dag for obduktion.

Testkemikalie

— oprindelse, parti-/batchnummer, betegnelse, renhed, leverandørens fuldstændige adresse og karakterisering af testkemikalie(r)

— fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— opbevaringsforhold samt metode og frekvens for tilberedning af fortynding

— evt. data genereret vedrørende stabilitet

— evt. analyser af testopløsninger/-suspensioner.

▼**M5**

Vehikel

— karakterisering af vehikel (betegnelse, leverandør og batchnr.)

— begrundelse for valg af vehikel (hvis andet end vand).

Forsøgsdyr og procedurer for dyrehold

— anvendt art/stamme og begrundelse for valg

— dyrenes oprindelse eller leverandør, herunder fuldstændig adresse

— antal leverede dyr og deres alder

— miljøbetingelser (temperatur, belysning osv.)

— foder (navn, type, leverandør, partinummer, indhold, og hvis det er kendt, fytoøstrogenniveauer)

— strøelse (navn, type, leverandør, indhold)

— anbringelsesforhold og antal dyr pr. bur.

Assaybetingelser

— alder ved kastration og akklimatiseringens varighed efter kastration

— de enkelte dyrs vægt ved undersøgelsens begyndelse (til nærmeste 0,1 g)

— randomiseringsproces og registrering af fordelingen til vehikel-, reference-, testkemikaliegrupper og bur

— kropsvægtgennemsnit og -standardafvigelse for hver gruppe for hver vejedag under hele undersøgelsen

— rationale for valg af dosis

— indgift af testkemikalie og rationale for valg af eksponeringsvej

— i tilfælde af assay for antiandrogenicitet, TP-behandling (dosis og volumen)

— testkemikaliebehandling (dosis og volumen)

— doseringstidspunkt

— obduktionsprocedurer, herunder afblødningsmetoder og evt. bedøvelsesmidler

— hvis der foretages serumanalyser, oplyses metode Hvis der f.eks. foretages radioimmunanalyse (RIA), rapporteres RIA-procedure, leverandør af RIA-udstyr, udstyrets udløbsdatoer, procedurer for scintillationstælling og standardisering.

Resultater

— daglige observationer for hvert dyr under dosering, herunder:

— kropsvægt (til nærmeste 0,1 g)

— (evt.) kliniske tegn

— måling af eller notater vedrørende foderindtagelse

— obduktionsobservationer for hvert dyr, herunder:

▼**M5**

— obduktionsdato

— dyrets behandlingsgruppe

— dyret id

— prosektor

— tidspunkt på dagen, hvor obduktion og dissektion er foretaget

— dyrets alder

— endelig kropsvægt ved obduktion med angivelse af statistisk signifikant stigning eller fald

— rækkefølge for afblødning og dissektion af dyret ved obduktion

— vægt for de fem androgenafhængige målvæv:

— ventral prostata (til nærmeste 0,1 mg)

— vesiculae seminales med prostata anterior, inkl. væske (parrede til nærmeste 0,1 mg)

— levator ani plus bulbocavernosus-muskelkompleks (til nærmeste 0,1 mg)

— Cowpers kirtler (frisk vægt — parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— glans penis (frisk vægt til nærmeste 0,1 mg)

— vægt af valgfrie væv, hvis de måles:

— lever (til nærmeste 0,1 g)

— nyrer (parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— binyrer (parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— generelle bemærkninger og kommentarer

— evt. serumanalyser af hormoner

  — serum LH (valgfrit — ng pr. ml serum)

  — serum T (valgfrit — ng pr. ml serum)

— generelle bemærkninger og kommentarer.

Opsummering af data

Data opsummeres i tabelform indeholdende prøvestørrelse for hver gruppe, middelværdi og standardmiddelfejl eller standardafvigelse. Tabellerne skal indeholde kropsvægt ved obduktion, ændringer i kropsvægt fra doseringens begyndelse indtil obduktion, vægt af sekundære målkønsvæv og evt. valgfri organvægt.

Diskussion af resultater

Analyse af resultater

59. Krops- og organvægt ved obduktion analyseres statistisk for kendetegn såsom varianshomogenitet med passende transformation af data efter behov. Behandlingsgrupper sammenlignes med en kontrolgruppe under anvendelse af teknikker såsom ANOVA efterfulgt af parvise sammenligninger (f.eks. Dunnetts ensidede test) og kriteriet for statistisk forskel, f.eks. $p \leq 0{,}05$. De grupper, som opnår statistisk signifikans, identificeres. »Relativ organvægt« bør dog undgås på grund af de ugyldige statistiske antagelser, der ligger til grund for denne datamanipulation.

▼**M5**

60. For androgen agonisme skal kontrollen være testgruppen, som kun får vehikel. Et testkemikalies karakteristiske virkemåde kan føre til forskellige relative reaktioner mellem væv, f.eks. trenbolon, som ikke kan være 5α-reduceret og har mere udtalte virkninger på LABC og GP, end TP har. En statistisk signifikant stigning ($p \leq 0,05$) i to eller flere af de fem androgenafhængige målvævs vægt (VP, LABC, GP, CG og SVCG) betragtes som et positivt androgenagonistresultat, og alle målvæv bør udvise en vis grad af vækstforøgelse. En kombineret evaluering af alle sekundære kønsorganers vævsreaktioner kan fås gennem en passende flerdimensional dataanalyse. Dette kan forbedre analysen, især i tilfælde, hvor kun et enkelt væv giver en statistisk signifikant respons.

61. For androgenantagonisme skal kontrollen være den testgruppe, som kun får referenceandrogen (kun testosteronpropionat). Et testkemikalies karakteristiske virkemåde kan føre til forskellige relative reaktioner mellem væv, f.eks. har 5α-reduktasehæmmere som finasterid mere udtalte virkninger på ventral prostata end andre væv sammenlignet med potente AR-antagonister såsom flutamid. En statistisk signifikant reduktion ($p \leq 0,05$) i to eller flere af de fem androgenafhængige målvævs vægt (VP, LABC, GP, CG og SVCG) i forhold til TP-behandling alene betragtes som et positivt androgenantagonistresultat, og alle målvæv bør udvise en vis grad af vækstreduktion. En kombineret evaluering af alle sekundære kønsorganers vævsreaktioner kan fås gennem en passende flerdimensional dataanalyse. Dette kan forbedre analysen, især i tilfælde, hvor kun et enkelt væv giver en statistisk signifikant respons.

62. Data opsummeres i tabelform indeholdende middelværdi, standardmiddelfejl (standardafvigelse vil også være acceptabel) og prøvestørrelse for hver gruppe. Individuelle datatabeller medtages også. De individuelle værdier, middelværdi, standardmiddelfejl (standardafvigelse) og variationskoefficientværdier for kontroldataene undersøges for at fastslå, om de opfylder acceptable kriterier for konsistens med forventede tidligere værdier. Variationskoefficienter, der overskrider variationskoefficientværdier anført i tabel 1 (se pkt. 25 og 26) for hver organvægt, afgør, om der er fejl i dataregistrering eller -indlæsning, eller om laboratoriet endnu ikke har behersket nøjagtig dissektion af de androgenafhængige væv, og yderligere uddannelse/praksis er berettiget. Normalt er variationskoefficienter (standardafvigelsen divideret med den gennemsnitlige organvægt) reproducerbar fra laboratorium til laboratorium og fra undersøgelse til undersøgelse. De fremlagte data skal som minimum omfatte: vægt af ventral prostata, vesiculae seminales, levator ani plus bulbocavernosus, Cowpers kirtler, glans penis, lever samt kropsvægt og kropsvægtændring fra begyndelsen af doseringen til obduktion. Dataene kan også præsenteres efter kovariansjustering for kropsvægt, men dette erstatter ikke fremlæggelse af de ujusterede data. Såfremt præputial separation (PPS) ikke forekommer i nogen af grupperne, registreres desuden PPS-forekomsten, der sammenlignes statistisk med kontrolgruppen under anvendelse af Fisher Exact-testen.

▼**M5**

63. Ved kontrol af computerindlæsninger af data med de originale datablade med henblik på nøjagtighed skal organvægtværdier, som ikke er biologisk plausible eller varierer med mere end tre standardafvigelser fra den pågældende behandlingsgruppes gennemsnit, nøje undersøges, og man kan være nødt til at se bort fra dem, da de sandsynligvis er registreringsfejl.

64. En sammenligning af undersøgelsesresultater med OECD's variationskoefficientværdier (i tabel 1) er ofte et vigtigt skridt i fortolkningen af undersøgelsesresultaternes validitet. Tidligere data for vehikelkontrolgrupper opbevares i laboratoriet. Tidligere data for reaktioner på positive referencekemikalier såsom TP og FT skal også opbevares i laboratoriet. Laboratorierne kan også periodisk teste reaktionen på kendte svage androgenagonister og -antagonister og opbevare disse data. Disse data kan sammenlignes med tilgængelige OECD-data for at sikre, at laboratoriets metoder giver tilstrækkelig statistisk præcision og styrke.

▼**M5**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Androgen er en term, der bruges til at beskrive en positiv påvirkning af væksten af androgenafhængige væv.

Antiandrogen er et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af TP i et pattedyrs organisme.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Fødselsdato er dag 0 efter fødslen (PND).

Dosis er mængden af indgivet testkemikalie. For Hershberger-bioassayet udtrykkes dosis som vægt af et testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets kropsvægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag).

Dosering er en generel term, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Moribund er en term, der bruges til at beskrive et dyr, som er døende.

Postnatal dag X er den X. levedag efter fødselsdagen (PND).

Følsomhed er en testmetodes evne til korrekt at identificere kemikalier, der har den egenskab, som der testes for.

Specificitet er en testmetodes evne til korrekt at identificere kemikalier, der ikke har den egenskab, som der testes for.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

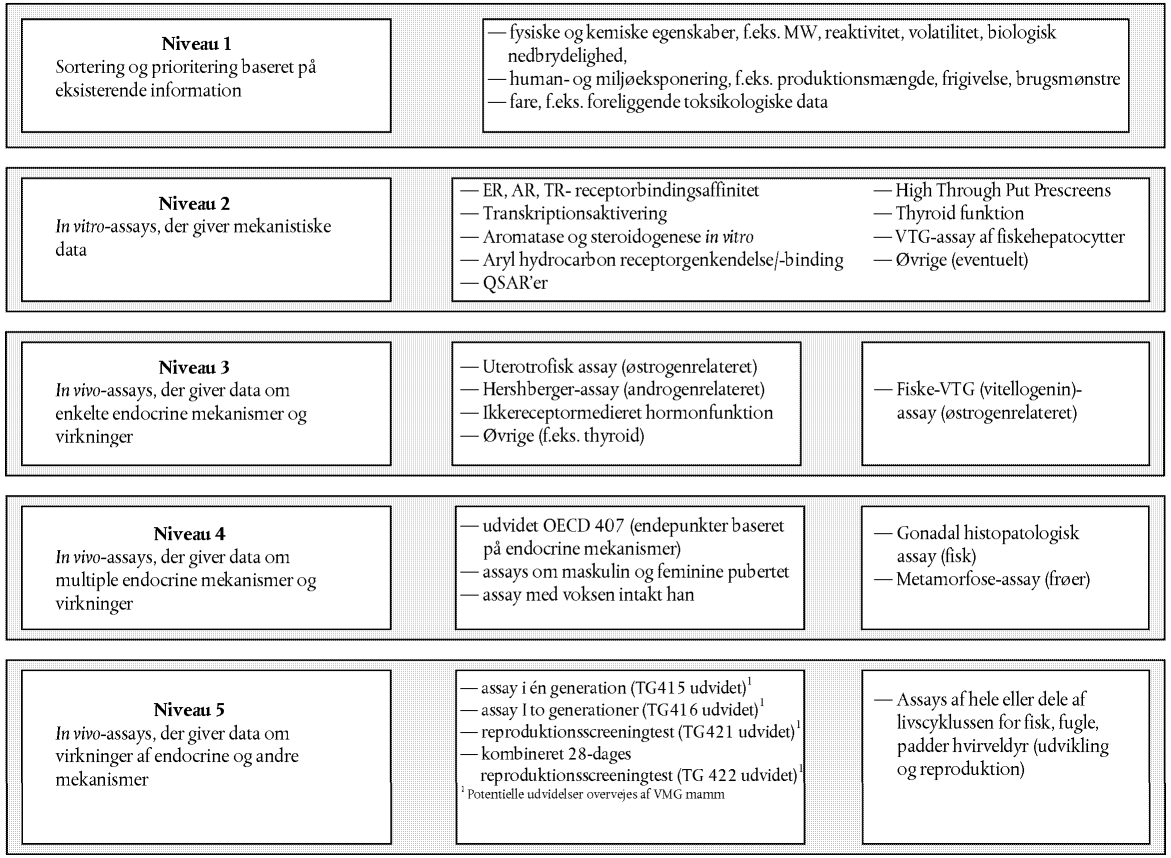
Validering er en videnskabelig proces til at karakterisere en testmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvise dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

▼M5

Tillæg 2

Note: Dokument udarbejdet af sekretariatet for testvejledningsprogrammet baseret på den aftale, der blev indgået på det sjette møde i EDTA-taskforcen

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTER TIL RAMMEN

Note 1: Det er muligt at gå ind og ud på alle niveauer; afhænger af arten af eksisterende informationsbehov med henblik på fare- og risikovurdering.

Note 2: På niveau 5 skal økotoksikologi omfatte endepunkter, der viser skadelige virkningsmekanismer og potential skade på befolkningen.

Note 3: Når en multimodal model dækker flere single endpoint assays, vil modellen erstatte brugen af de pågældende single endpoint assays.

Note 4: Vurderingen af hvert kemikalie skal ske i hvert enkelt tilfælde under inddragelse af al tilgængelig information og under hensyntagen til rammeniveauernes funktion.

Note 5: Rammen omfatter ikke alt på det givne tidspunkt. På niveau 3, 4 og 5 omfatter den assays, der enten er tilgængelige, eller hvor valideringen er på vej. Med hensyn til sidstnævnte er disse foreløbigt inkluderet. Når de er udviklet og valideret, vil de blive formelt tilføjet til rammen.

Note 6: Niveau 5 omfatter ikke kun endelige test. Test inkluderet på dét niveau bidrager til generel fare- og risikovurdering.

LITTERATUR

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

2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

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

18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21) Supplemental materials for Owens et al. (2006) The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Se afsnit II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

22) Korea Food and Drug Administration. Visuelt opslagsværk om Hershberger-assayproceduren, herunder en dissektionsvideo. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

26) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

27) Følgende kapitler i dette bilag:

B.1.A, Akut oral toksicitet — fastdosismetoden

B.1.B, Akut oral toksicitet — akut toksicitetsklassemetoden

▼M5

B.56. UDVIDET REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I ÉN GENERATION

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 443 (2012). Den er baseret på forslaget fra International Life Science Institute (ILSI)-Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) Technical Committee til en F_1-udvidet livsstadie-reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation som offentliggjort i Cooper et al., 2006 (1). Der er foretaget flere forbedringer og præciseringer i undersøgelsesdesignet for at sikre fleksibilitet og understrege betydningen af at begynde med eksisterende viden og samtidig bruge observationer i levende live til at styre og skræddersy testen. Denne testmetode giver en detaljeret beskrivelse af den operationelle udførelse af en udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Testmetoden indeholder en beskrivelse af tre kohorter af F_1-dyr:

kohorte 1: vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige endepunkter. Denne kohorte kan udvides til at omfatte en F_2-generation

kohorte 2: vurdering af den potentielle virkning af kemikalieeksponering på det endnu ikke færdigudviklede nervesystem

kohorte 3: vurdering af den potentielle virkning af kemikalieeksponering på det endnu ikke færdigudviklede immunsystem.

2. Beslutninger om, hvorvidt den anden generation skal vurderes, og udviklingsneurotoksicitetskohorten og/eller udviklingsimmunotoksicitetskohorten udelades, skal afspejle eksisterende viden om det kemikalie, som evalueres, samt forskellige myndigheders behov. Formålet med testmetoden er at skaffe oplysninger om, hvordan undersøgelsen kan udføres, og vise, hvordan hver kohorte skal evalueres.

3. Proceduren for beslutningen om, hvad der internt udløser produktionen af en anden generation, beskrives i OECD's vejledning 117 (39) for de regeludstedende myndigheder, som anvender interne triggere.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG FORMÅL

4. Hovedformålet med den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation er at vurdere specifikke livsstadier, som ikke er dækket af andre typer af toksicitetsundersøgelser, og teste for virkninger, der kan forekomme som resultat af eksponering for kemikalier før og efter fødslen. Som endepunkter for reproduktionsevnen er det planen, at der som første trin bruges evt. tilgængelig information fra undersøgelser med gentagen dosis (bl.a. screeningundersøgelser af reproduktionstoksicitet, f.eks. OECD TG 422 (32)) eller korttidsscreeningassays af hormonforstyrrende stoffer (f.eks. et uterotrofisk assay — testmetode B.54 (36) og Hershberger-assay — testmetode B.55 (37)) til at detektere virkninger på hanners og hunners reproduktionsorganer. Det kunne omfatte spermatogenese (testikulær histopatologi) for hanner og brunstcyklusser, follikeltælling/oocytmodning og ovarieintegritet (histopatologi) for hunner. Den udvidedereproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation tjener herefter som test for endepunkterne for reproduktionsevnen, som kræver samspil mellem hanner og hunner, hunner med conceptus og hunner med afkom og F_1-generationen indtil efter kønsmodning (se OECD's vejledning 151, som underbygger denne testmetode (40)).

▼M5

5. Testmetoden er udformet, så den giver en evaluering af kemikaliers præ- og postnatale virkninger på udviklingen samt en grundig evaluering af systemisk toksicitet hos drægtige og diegivende hunner og ungt og voksent afkom. En detaljeret undersøgelse af vigtige udviklingsmæssige endepunkter såsom afkommets levedygtighed, neonatale sundhed, udviklingsmæssige status ved fødslen og fysiske og funktionsmæssige udvikling indtil voksenalderen forventes at afdække bestemte målorganer hos afkommet. Endvidere vil undersøgelsen give og/eller bekræfte oplysninger om et testkemikalies virkninger på voksne hanners og hunners forplantningssystemers integritet og ydeevne. Specifikt, men ikke udelukkende, betragtes følgende parametre: gonadefunktion, brunstcyklus, modning af sperma i epididymis, parringsadfærd, konception, drægtighed, nedkomst og diegivning. Endvidere vil oplysninger fra udviklingsneurotoksicitets- og udviklingsimmunotoksicitetsvurderingerne karakterisere potentielle virkninger i de pågældende systemer. Data afledt af disse test bør give mulighed for at bestemme niveauer uden observerede negative effekter (NOAEL'er), laveste niveauer for observerede negative effekter (LOAEL'er) og/eller benchmarkdoser for de forskellige endepunkter og/eller kan bruges til at karakterisere virkninger detekteret i tidligere undersøgelser med gentagen dosis og/eller tjene som vejledning for efterfølgende test.

6. En skematisk tegning af protokollen kan ses i figur 1. Testkemikaliet indgives kontinuerligt i graduerede doser til forskellige grupper af kønsmodne hanner og hunner. Denne forældregeneration (P-generation — F_0) modtager testkemikaliet i en defineret periode før parring (valgt på grundlag af tilgængelig information om testkemikaliet, men mindst to uger) og i en to uger lang parringsperiode. P-hanner behandles yderligere mindst indtil fravænning af F_1. De behandles i mindst 10 uger. De kan behandles længere, hvis der er behov for at afklare virkninger på reproduktionen. Behandling af P-hunnerne fortsættes under drægtighed og diegivning, indtil deres kuld er fravænnet (dvs. 8-10 ugers behandling). F_1-afkommet modtager yderligere behandling med testkemikaliet fra fravænning til voksenalderen. Hvis en anden generation vurderes (se OECD's vejledning 117 (39)), skal F_1-afkommet fortsat være under behandling indtil fravænningen af F_2, eller indtil undersøgelsen afsluttes.

7. Kliniske observationer og patologiske undersøgelser udføres på alle dyr for tegn på toksicitet med særlig vægt på hanners og hunners forplantningssystemers integritet og ydeevne samt afkommets sundhed, vækst, udvikling og funktionsevne. Ved fravænningen tilordnes udvalgte unger til særlige undergrupper (kohorte 1-3, se pkt. 33 og 34 og figur 1) til yderligere undersøgelser, bl.a. kønsmodning, kønsorganernes integritet og funktion, neurologiske og adfærdsmæssige endepunkter samt immunfunktioner.

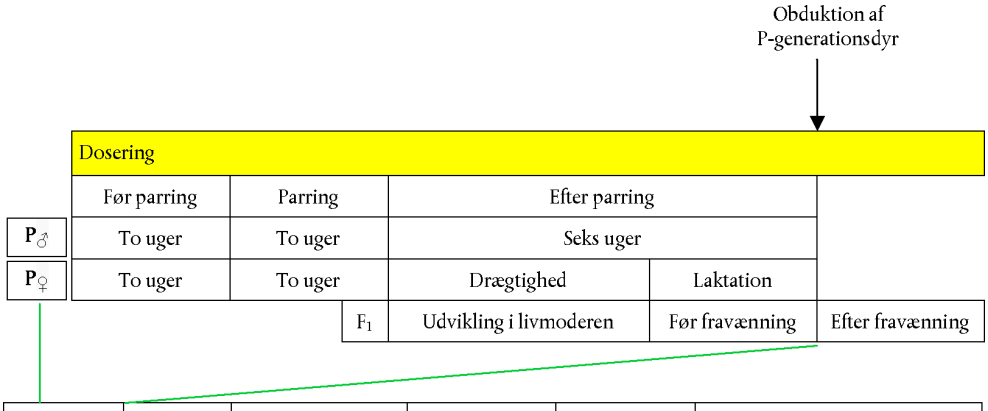
8. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledning nr. 19, om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (34).

▼M5

9. Når et tilstrækkeligt antal undersøgelser er tilgængelige til at konstatere, hvordan dette nye undersøgelsesdesign virker, skal testmetoden gennemgås og om nødvendigt revideres på baggrund af de indhøstede erfaringer.

Figur 1

Skema over den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation



Forældre-generation	Kohorte	Betegnelse	Dyr/kohorte	Kønsmodning	Omtrentlig alder ved obduktion (uger)
Målet er 20 kuld pr. gruppe	1A	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	13
	1B	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	14 eller 20-25, hvis dette tilsiges
	2A	Neurotoksicitet	10 M + 10 F @	Ja	11-12
	2B	Neurotoksicitet	10 M + 10 F @	Nej	3
	3	Immunotoksicitet	10 M + 10 F @	Ja	8
	Overskud	Reserver		Nej	3

@ én pr. kuld og repræsentativt for 20 kuld, hvis det er muligt

BESKRIVELSE AF METODEN/FORBEREDELSER TIL TESTEN

Dyr

Valg af dyreart og stamme

10. Valget af art til reproduktionstoksicitetstesten overvejes nøje med udgangspunkt i al tilgængelig information. På grund af omfanget af baggrundsdata og sammenligneligheden med generelle toksicitetstest foretrækkes rotten dog normalt, og kriterier og henstillinger i denne testmetode vedrører denne art. Hvis en anden art anvendes, skal det begrundes, og relevante ændringer i protokollen vil være nødvendige. Stammer med lav frugtbarhed eller en velkendt høj forekomst af spontane udviklingsdefekter bør ikke anvendes.

Alder, kropsvægt og inddragelseskriterier

11. Der anvendes sunde forældredyr, som ikke har været omfattet af tidligere testprocedurer. Både hanner og hunner skal undersøges, og hunnerne må ikke tidligere have født eller være drægtige. P-dyrene skal være kønsmodne, af samme vægt (inden for køn) ved indledning af doseringen, være af samme alder (ca. 90 dage) ved parring og være repræsentative for den undersøgte art og stamme. Dyrene akklimatiseres i mindst fem dage efter ankomst. Dyrene tilordnes vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper på en måde, som giver sammenlignelige gennemsnitlige kropsvægtværdier mellem grupperne (dvs. ± 20 % af gennemsnittet).

▼**M5**

Miljøbetingelser og fodring

12. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være 30-70 % med et ideelt niveau på 50-60 %. Den kunstige belysning fastsættes til 12 timers lys og 12 timers mørke. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Foderets fytoøstrogene indhold overvåges nøje, da et højt fytoøstrogenniveau i foderet kan påvirke visse reproduktionsmæssige endepunkter. Standardiseret foder med oplyst sammensætning og reduceret indhold af østrogene kemikalier anbefales (2) (30). Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af testkemikaliet, når denne indgiftsmåde anvendes. Testkemikaliets indhold, homogenitet og stabilitet i foderet skal kontrolleres. Foder og drikkevand analyseres jævnligt for forurenende stoffer. Prøver på hver batch foder, der anvendes under undersøgelsen, opbevares under passende forhold (f.eks. frosset ved – 20 °C), indtil rapporten er færdig, i tilfælde af at resultaterne kræver en yderligere analyse af foderingredienserne.

13. Dyrene anbringes i bure i små grupper af samme køn og behandlingsgruppe. De kan anbringes enkeltvis for at undgå mulige skader (f.eks. hanner efter parringsperioden). Parring skal finde sted i egnede bure. Efter bevis for kopulation anbringes hunner, som antages at være drægtige, separat i fødsels- eller yngelbure, hvor de forsynes med passende og defineret redemateriale. Kuldene anbringes med deres mødre indtil fravænning. F_1-dyr anbringes i små grupper af samme køn og behandlingsgruppe fra fravænning til undersøgelsens afslutning. Hvis det er sagligt begrundet, kan dyrene anbringes individuelt. Indholdet af fytogenøstrogener i det valgte strøelsesmateriale skal være minimalt.

Antal og identifikation af dyr

14. Normalt skal hver forsøgs- og kontrolgruppe indeholde et tilstrækkeligt antal parrede dyr til, at der kan blive mindst 20 drægtige hunner pr. dosisgruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af kemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i P-generationen samt vækst og udvikling i F_1-generationen fra konception til kønsmodning. Hvis det ikke lykkes at frembringe det ønskede antal drægtige dyr, er undersøgelsen ikke nødvendigvis ugyldig, og der bør finde en konkret vurdering sted i det enkelte tilfælde, idet en mulig årsagssammenhæng med testkemikaliet overvejes.

15. Hvert P-dyr tildeles et entydigt identifikationsnummer, før doseringen påbegyndes. Såfremt tidligere laboratoriedata tyder på, at en signifikant del af hunnerne måske ikke har regelmæssige (fire- eller femdages) brunstcyklusser, anbefales det at foretage en vurdering af brunstcyklusserne før behandlingens start. Alternativt kan gruppestørrelsen øges for at sikre, at mindst 20 hunner i hver gruppe har regelmæssige (fire- eller femdages) brunstcyklusser ved behandlingens begyndelse. Alt F_1-afkom identificeres entydigt, når de nyfødte undersøges første gang på dag 0 eller 1 efter fødslen (PND) Under hele undersøgelsen registreres det for alle udvalgte F_1-dyr og evt. F_2-dyr, hvilket kuld de er fra.

▼M5

Testkemikalie

Tilgængelig information om testkemikaliet

16. Det er vigtigt at gennemgå eksisterende information med henblik på beslutninger om indgiftsvej, valg af vehikel, valg af dyreart, valg af doseringer og potentielle ændringer af doseringsplan. Derfor skal alle relevante tilgængelige informationer om testkemikaliet, dvs. fysisk-kemiske, toksikokinetiske (herunder artsspecifik metabolisme), toksikodynamiske egenskaber, struktur-aktivitetsrelationer (SAR), metaboliske processer in vitro, resultater af tidligere toksicitetsundersøgelser og relevant information om strukturelt beslægtede stoffer, tages i betragtning ved planlægning af den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Foreløbig information om absorption, distribution, metabolisme og eliminering (ADME) og bioakkumulation kan afledes af kemisk struktur, fysisk-kemiske data, omfanget af plasmaproteinbinding eller toksikokinetiske (TK) undersøgelser, mens resultater af toksicitetsundersøgelser giver supplerende information, f.eks. om NOAEL, metabolisme eller induktion af metabolisering.

Overvejelser om toksikokinetiske data

17. TK-data fra tidligere gennemførte range-finding-undersøgelser af dosis eller andre undersøgelser er ikke påkrævede, selv om de er særdeles nyttige ved planlægningen af undersøgelsesdesign, valg af dosisniveauer og fortolkning af resultater. Særligt nyttige er data, som: 1) kontrollerer eksponering af ikkefærdigudviklede fostre samt unger for testkemikaliet (eller relevante metabolitter), 2) giver et skøn over intern dosimetri og 3) evaluerer potentiel dosisafhængig mætning af kinetiske processer. Evt. supplerende TK-data såsom metabolitprofiler, koncentrationstidsforløb osv. skal også overvejes. Supplerende TK-data kan også indsamles i løbet af hovedundersøgelsen, forudsat at det ikke griber forstyrrende ind i indsamling og fortolkning af hovedundersøgelsens endepunkter.

Som en generel vejledning vil følgende TK-datasæt være nyttige i planlægningen af den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation:

— sen drægtighed (f.eks. den 20. dag i drægtighedsperioden) — moderens blod, fostrets blod

— midt i diegivningsperioden (PND 10) — moderens blod, ungens blod og/eller mælk

— tidlig fravænningsperiode (f.eks. PND 28) — prøver fra det fravænnede dyr.

Der udvises fleksibilitet ved bestemmelsen af specifikke analyter (f.eks. oprindeligt kemikalie og/eller metabolitter) og prøveudtagningsplan. F.eks. vil antallet af og tidspunkter for prøveindsamlinger på en given prøveindsamlingsdag afhænge af eksponeringsvej og forudgående viden om TK-egenskaber hos ikkedrægtige dyr. Til foderundersøgelser er prøvetagning på et enkelt konsistent tidspunkt på hver af disse dage tilstrækkeligt, mens sondedosering kan kræve yderligere prøvetagningstidspunkter for at opnå et bedre skøn over spektret af interne doser. Det er dog ikke nødvendigt at generere et fuldt koncentrationstidsforløb på nogen af prøvetagningsdagene. Om nødvendigt kan blod samles efter køn inden for kuld med henblik på foster- og neontalanalyser.

▼**M5**

Indgiftsvej

18. Ved valg af indgiftsvej tages hensyn til de(n) vej(e), som er mest relevant(e) i forbindelse med human eksponering. Skønt protokollen er designet til indgift af testkemikaliet gennem foderet, kan den ændres til indgift ad andre veje (drikkevand, sonde, inhalation, dermal optagelse) alt efter kemikaliets karakteristika og de ønskede oplysninger.

Valg af vehikel

19. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikaliet i et egnet vehikel. Hvor det er muligt, anbefales det først at se på anvendelsen af en vandig opløsning/suspension og herefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie). For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Anvendelsen af vehikler med potentiel iboende toksicitet skal undgås (f.eks. acetone, DMSO). Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Der tages hensyn til følgende karakteristika, hvis et vehikel eller andet tilsætningsstof anvendes til at lette doseringen: indvirkningen på testkemikaliets absorption, distribution, metabolisme eller retention; virkninger på testkemikaliets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske karakteristika, samt indvirkningen på dyrenes føde- og vandindtagelse eller ernæringstilstand.

Valg af dosis

20. Normalt skal undersøgelsen omfatte mindst tre dosisniveauer og en sideløbende kontrol. Ved valg af passende dosisniveauer skal undersøgeren se på al tilgængelig information, herunder doseringsinformation fra tidligere undersøgelser, TK-data fra drægtige eller ikkedrægtige dyr, omfanget af mælkeoverførsel og skøn over human eksponering. Hvis tilgængelige TK-data viser dosisafhængig mætning af TK-processer, skal høje dosisniveauer, der klart viser mætning, omhyggeligt undgås, forudsat naturligvis, at menneskers eksponeringer forventes at ligge en del under mætningspunktet. I sådanne tilfælde skal det højeste dosisniveau ligge på eller bare lidt over vendepunktet for overgangen til ikkelineær TK-adfærd.

21. I mangel af relevante TK-data baseres dosisniveauerne på toksiske virkninger, medmindre de er begrænset af testkemikaliets fysisk-kemiske art. Er dosisniveauerne baseret på toksicitet, vælges den højeste dosis med det formål at fremkalde en vis systemisk toksicitet, men ikke dyrets død eller alvorlig lidelse.

22. En faldende række dosisniveauer vælges for at påvise evt. dosisafhængige virkninger og fastslå NOAEL'er eller doser nær detektionsgrænsen, som vil give mulighed for at udlede en benchmarkdosis for de mest følsomme endepunkter. For at undgå store dosismellemrum mellem NOAEL'er og LOAEL'er er to- eller firefoldsintervaller ofte optimalt. Det foretrækkes ofte at tilføje en fjerde testgruppe i stedet for at anvende et meget stort interval (f.eks. mere end en faktor 10) mellem doserne.

23. Med undtagelse af behandling med testkemikaliet håndteres dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Denne gruppe skal være ubehandlet eller have placebo eller være en vehikelkontrolgruppe, hvis der anvendes et vehikel til indgift af testkemikaliet. Hvis der bruges et vehikel, skal kontrolgruppen have vehiklet i den højeste mængde, der bruges.

▼M5

Grænsetest

24. Såfremt der ikke er evidens for toksicitet ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag i undersøgelser med gentagen dosis, eller hvis data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede kemikalier, som ligner hinanden med hensyn til in vivo/in vitro-metaboliske egenskaber ikke giver anledning til at forvente toksicitet, er en undersøgelse med flere dosisniveauer måske ikke nødvendig. I sådanne tilfælde kunne den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation foretages med en kontrolgruppe og en enkelt dosis på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. Skulle der imidlertid blive konstateret evidens for reproduktions- eller udviklingsmæssig toksicitet ved denne grænsedosis, vil yderligere undersøgelser ved lavere dosisniveauer være påkrævet for at identificere NOAEL. Disse grænsetestovervejelser gælder kun, når human eksponering ikke indikerer behovet for et højere dosisniveau.

PROCEDURER

Eksponering af afkom

25. Fodereksponering er den foretrukne indgiftsmetode. Hvis der udføres undersøgelser med indgift gennem sonde, skal det bemærkes, at ungerne normalt kun får testkemikaliet indirekte gennem mælken, indtil direkte dosering begynder for dem ved fravænning. I undersøgelser med indgift gennem foder eller drikkevand vil ungerne desuden modtage testkemikaliet direkte, når de begynder selv at æde i den sidste uge af laktationsperioden. Ændringer i undersøgelsesdesignet skal overvejes, når udskillelse af testkemikaliet i mælken er dårlig, og hvis der mangler evidens for, at afkommet stadig eksponeres. I disse tilfælde overvejes en direkte dosering af unger i laktationsperioden på grundlag af tilgængelig TK-information, toksicitet i afkommet eller ændringer i biomarkører (3) (4). Fordele og ulemper overvejes omhyggeligt, før der foretages undersøgelser med direkte dosering på unger i laktationsperioden (5).

Doseringsplan og indgift af doser

26. Nogle oplysninger om brunstcyklusser, histopatologi for hanners og hunners forplantningssystem og analyse af testis-/epididymissperma kan være tilgængelige fra tidligere toksicitetsundersøgelser med gentagen dosis af passende varighed. Varigheden af behandlingen før parring i den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation har derfor til formål at detektere virkninger på funktionsændringer, der kan forstyrre parringsadfærd og befrugtning. Behandlingen før parring skal være tilstrækkeligt lang til at opnå ligevægtseksponeringsbetingelser hos P-hanner og -hunner. En to uger lang behandling før parring anses for passende for begge køn i de fleste tilfælde. For hunner dækker dette tre til fire fulde brunstcyklusser og bør være tilstrækkeligt til at detektere evt. skadevirkninger på cykliciteten. For hanner svarer det til den tid, der er nødvendig for epididymal transit af modnende spermatozoer, og bør give mulighed for at detektere posttestikulære virkninger på spermaen (under de sidste stadier af spermiation og spermamodning i epididymis) ved parring. Ved testens afslutning, når tidspunkterne fastsættes for histopatologisk undersøgelse af testikler og epididymis og analyse af spermaparametre, vil P- og F_1-hannerne have været eksponeret i mindst én hel spermatogen proces ((6) (7) (8) (9) og OECD's vejledning 151 (40)).

▼M5

27. Eksponeringsscenarierne for hanner før parring kan justeres, hvis testikeltoksicitet (forringelse af spermatogenesen) eller virkninger på spermaintegritet og -funktion er blevet klart identificeret i tidligere undersøgelser. På samme måde kan kendte virkninger af testkemikaliet på brunstcyklussen og dermed befrugtningsdygtigheden for hunner begrunde andre eksponeringsscenarier før parring. I særlige tilfælde kan det være acceptabelt, at behandling af P-hunner først indledes, efter at der er opnået et spermapositivt smear (se OECD's vejledning 151 (40)).

28. Når doseringsperioden før parring er fastlagt, behandles dyrene kontinuerligt med testkemikaliet syv dage om ugen indtil obduktion. Alle dyr doseres ved samme metode. Dosering fortsætter i den to uger lange parringsperiode og for P-hunner gennem drægtighed og laktation indtil afslutningen af testen efter fravænning. Hanner behandles på samme måde indtil testens afslutning på det tidspunkt, hvor F_1-dyrene er vænnet fra. Til obduktion prioriteres hunnerne højest, idet de obduceres på samme laktationsdag. Obduktion af hanner kan spredes over et større antal dage alt efter laboratoriets faciliteter. Medmindre den direkte dosering af udvalgte F_1-hanner og -hunner er iværksat i laktationsperioden, påbegyndes den ved fravænning og fortsætter indtil planlagt obduktion alt efter kohortetilordningen.

29. Når kemikalier indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliet ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliet indgives i foderet, kan der bruges enten en konstant foderkoncentration (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt. Den valgte mulighed angives.

30. Indgives testkemikaliet ved sonde, må den indgivne væskemængde på én gang normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt (0,4 ml/100 g kropsvægt er maksimum for olie, f.eks. majsolie). Hvis der ikke er tale om lokalirriterende eller ætsende kemikalier, hvis effekt sædvanligvis er værre ved højere koncentrationer, skal variabiliteten af testvolumenet minimeres gennem justering af koncentrationen, således at der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Behandlingen indgives på samme tidspunkter hver dag. Dosis til hvert dyr baseres normalt på den seneste individuelle bestemmelse af kropsvægt og justeres mindst én gang om ugen for voksne hanner og voksne ikkedrægtige hunner og hver anden dag for drægtige hunner og F_1-dyr, når indgiften sker før fravænning, og i to uger efter fravænningen. Hvis TK-data viser en lav placentaoverførsel af testkemikaliet, kan man være nødt til at justere sondedosis i den sidste drægtighedsuge for at undgå at indgive en alt for toksisk dosis til moderdyret. På dagen for fødslen må hunner ikke behandles med sonde eller andre indgiftsformer, hvor dyret skal håndteres. Det er bedre at undlade indgift af testkemikaliet den dag frem for at forstyrre fødselsprocessen.

▼M5

Parring

31. Hver P-hun anbringes sammen med en enkelt vilkårligt udvalgt ubeslægtet han fra samme dosisgruppe (1:1-parring), indtil der observeres evidens for kopulation, eller der er gået to uger. Hvis der ikke er hanner nok, f.eks. på grund af død inden parring, kan der parres en eller flere hanner, som allerede har været parret (1:1) med en anden hun/andre hunner, således at alle hunner parres. Dag 0 i drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor evidens for parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Dyr adskilles snarest muligt, efter at evidens for kopulation er observeret. Hvis parring ikke er sket efter to uger, adskilles dyrene uden yderligere mulighed for parring. De parrede dyr skal være tydeligt identificeret i dataene.

Kuldstørrelse

32. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fem handyr og fem hundyr pr. kuld. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt, er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel.

Udvælgelse af unger til undersøgelser efter fravænning (se figur 1)

33. Ved fravænning (omkring PND 21) vælges unger fra alle tilgængelige kuld, op til 20 pr. dosis- og kontrolgruppe, til yderligere undersøgelser og beholdes indtil kønsmodning (medmindre tidligere test er påkrævet). Ungerne vælges vilkårligt, bortset fra at de, der tydeligvis er mindst (dyr med en kropsvægt over to standardafvigelser under den gennemsnitlige vægt for unger i det respektive kuld), ikke medtages, da de sandsynligvis ikke vil være repræsentative for behandlingsgruppen.

På PND 21 tilordnes de udvalgte F_1-unger vilkårligt til en af de tre kohorter af dyr, som følger:

kohorte 1 (1A og 1B) = reproduktions-/udviklingstoksicitetstest

kohorte 2 (2A og 2B) = udviklingsneurotoksicitetstest

kohorte 3 = udviklingsimmunotoksicitetstest.

Kohorte 1A: Én han og én hun/ét kuld/én gruppe (20/køn/gruppe): prioriteret udvælgelse til primær vurdering af virkninger på forplantningssystemer og af generel toksicitet.

Kohorte 1B: Én han og én hun/ét kuld/én gruppe (20/køn/gruppe): prioriteret udvælgelse til opfølgende vurdering af reproduktionsevnen ved at parre F_1-dyr ved vurdering (se OECD's vejledning 117 (39)) og for at få supplerende histopatologiske data i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer, eller når resultaterne fra kohorte 1A er usikre.

Kohorte 2A: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én han eller én hun pr. kuld) tilordnes til neuroadfærdstest efterfulgt af neurohistopatologisk vurdering som voksne.

Kohorte 2B: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én han eller én hun pr. kuld) tilordnes til neurohistopatologisk vurdering ved afvænning (PND 21 eller PND 22). Hvis antallet af dyr er utilstrækkeligt, skal der helst tilordnes dyr til kohorte 2A.

▼M5

Kohorte 3: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én pr. kuld, hvor det er muligt). Yderligere unger kan være nødvendige fra kontrolgruppen til at fungere som positive kontroldyr i det T-celleafhængige antistofresponsassay (TDAR) på PND 56 ± 3.

34. Skulle der være et utilstrækkeligt antal unger i et kuld til alle kohorter, er kohorte 1 vigtigst, da den kan udvides til at producere en F_2-generation. Ekstra unger kan tilordnes til alle kohorter i tilfælde af særlige hensyn, f.eks. hvis et kemikalie mistænkes for at være et stof med neurotoksisk, immunotoksisk eller reproduktionstoksisk virkning. Disse unger kan anvendes til undersøgelser på forskellige tidspunkter eller til evaluering af supplerende endepunkter. Unger, som ikke tilordnes til kohorter, vil blive underkastet klinisk-biokemiske målinger (pkt. 55) og makroskopisk obduktion (pkt. 68).

Anden parring af P-dyr

35. En anden parring anbefales normalt ikke for P-dyr, da man derved mister vigtige oplysninger om antallet af implantationssteder (og således data om den letale virkning efter implantation og perinatalt tab, som er indikatorer for et muligt teratogent potentiale) for det første kuld. Behovet for at kontrollere eller klarlægge en virkning hos eksponerede hunner kan opfyldes bedre ved at udvide undersøgelsen til at omfatte en parring af F_1-generationen. En anden parring af P-hanner med ubehandlede hunner er dog altid en mulighed for at tydeliggøre usikre resultater eller for yderligere at karakterisere fertilitetsvirkninger observeret ved den første parring.

OBSERVATIONER I LEVENDE LIVE

Kliniske observationer

36. For P- og de udvalgte F_1-dyr foretages der en generel klinisk observation én gang om dagen. Ved sondedosering skal tidspunktet for kliniske observationer ligge før og efter doseringen (for mulige tegn på toksicitet i forbindelse med maksimal plasmakoncentration). Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller langvarig fødsel og alle tegn på toksicitet registreres. To gange dagligt og i weekenden én gang dagligt observeres alle dyr for svær toksicitet, morbiditet og mortalitet.

37. Endvidere foretages en mere detaljeret undersøgelse af alle P- og F_1-dyr (efter fravænning) én gang om ugen, hvilket passende kan ske i forbindelse med vejning af dyret, hvilket mindsker håndteringsstress. Observationerne foretages omhyggeligt og registreres under anvendelse af bedømmelsessystemer, som er defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at variationer i testbetingelserne er minimale. Observationerne rettes bl.a. mod ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Tillige registreres ændringer i gang, kropsholdning og reaktion på håndtering såvel som forekomst af kloniske eller toniske bevægelser, stereotyp optræden (f.eks. overdreven soignering, stadig kredsen i cirkelbevægelser) eller mærkelig adfærd (f.eks. selvmutilation, baglæns gang).

▼M5

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

38. P-dyr vejes den første doseringsdag og siden mindst én gang om ugen. Endvidere vejes diegivende P-dyr på de samme dage, som ungerne i deres kuld vejes (se pkt. 44). Alle F_1-dyr vejes individuelt ved fravænning (PND 21) og siden mindst én gang om ugen. Kropsvægten registreres også den dag, de når puberteten (når præputial separation eller vaginal åbning er afsluttet). Alle dyr vejes ved aflivning.

39. I løbet af undersøgelsen registreres foder- og vandindtagelse (såfremt testkemikaliet indgives i drikkevandet) mindst én gang om ugen den samme dag som vejningen af dyrets kropsvægt (undtagen i den periode, hvor dyrene er sammen). Foderindtagelsen for hvert bur med F_1-dyr registreres ugentligt og påbegyndes ved udvælgelsen til de respektive kohorter.

Brunstcyklusser

40. Foreløbig information om testkemikaliets virkninger på brunstcyklussen kan allerede være tilgængelig fra tidligere toksicitetsundersøgelser med gentagen dosis og kan bruges til udformning af en testkemikaliespecifik protokol til den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Normalt vil vurderingen af brunstcyklus (ved vaginal cytologi) starte ved begyndelsen af behandlingsperioden og fortsætte, indtil parringen er bekræftet eller til afslutningen af den to uger lange parringsperiode. Hvis hunnerne er blevet screenet for normal brunstcyklus før behandlingen, er det nyttigt at fortsætte med smearing, når behandlingen starter, men hvis man er bekymret for uspecifikke virkninger ved behandlingens begyndelse (såsom en markant reduktion i foderindtagelse i begyndelsen), kan dyrene få lov til at tilpasse sig behandlingen i op til to uger før begyndelsen af den tougers smearingperiode, der fører til parringen. Udvides hunnens behandlingsperiode på denne måde (dvs. til en fireugers behandling før parring), bør man tænke på at købe dyrene yngre og udvide hannens behandlingsperiode før parring. Udtagning af celleprøve fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå forstyrrelse af slimhinden med efterfølgende fremkaldelse af pseudodrægtighed (10) (11).

41. Vaginalt smear undersøges dagligt for alle F_1-hunner i kohorte 1A efter indtræden af vaginalåbning, og indtil det første forhornede smear er registreret, for at bestemme tidsintervallet mellem disse to hændelser. Brunstcyklusser for alle F_1-hunner i kohorte 1A overvåges også i en periode på to uger fra omkring PND 75. Skulle parring af F_1-generationen blive nødvendig, følges desuden den vaginale cytologi i kohorte 1B fra tidspunktet for parring, indtil der er evidens for parringen.

Parring og drægtighed

42. Ud over standardendepunkter (f.eks. kropsvægt, foderindtagelse, kliniske observationer, herunder mortalitets-/morbiditetskontroller) registreres datoerne for parring, datoen for insemination og datoen for fødsel, og det prækoitale interval (parring til insemination) og drægtighedens varighed (insemination til fødsel) beregnes. P-hunner undersøges omhyggeligt på tidspunktet for forventet fødsel for evt. tegn på dystoki. Evt. abnormiteter i redeadfærd eller yngelpleje registreres.

▼M5

43. Den dag, fødslen går i gang, er laktationsdag 0 (LD 0) for moderdyret og postnatal dag 0 (PND 0) for afkommet. Alternativt kan alle sammenligninger også baseres på postkoital tid for ikke at sammenblande postnatale udviklingsdata og forskelle i drægtighedens varighed, men tidspunktet for fødslen skal dog også registreres. Dette er særligt vigtigt, når testkemikaliet påvirker drægtighedens varighed.

Parametre for afkom

44. Hvert kuld undersøges snarest muligt efter fødslen (PND 0 eller 1) for at fastslå ungernes antal og køn, dødfødte, levendefødte og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter (eksternt synlige abnormiteter såsom ganespalte, subkutane blødninger, anormal hudfarve eller -tekstur, tilstedeværelse af navlestreng, manglende mælk i maven, tilstedeværelse af indtørrede sekreter). Desuden skal den første kliniske undersøgelse af nyfødte omfatte en kvalitativ vurdering af kropstemperatur, aktivitetsstatus og reaktion på håndtering. Unger, som findes døde på PND 0 eller senere, undersøges for mulige defekter og dødsårsag. Levende unger tælles og vejes individuelt på PND 0 eller PND 1 og regelmæssigt herefter, f.eks. som minimum på PND 4, 7, 14 og 21. Kliniske undersøgelser i forhold til dyrenes alder gentages, når afkommet vejes, eller oftere, hvis der er gjort konkrete fund ved fødslen. Tegn, der skal noteres, omfatter, men er ikke begrænset til, ydre abnormiteter, ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet. Tillige registreres ændringer i gang, kropsholdning og reaktion på håndtering såvel som forekomsten af kloniske eller toniske bevægelser, stereotyp optræden eller mærkelig adfærd.

45. Hver unges anogenitale afstand (AGD) måles mindst én gang fra PND 0 til PND 4. Ungens kropsvægt registreres den dag, AGD måles, og AGD normaliseres til et mål for ungens størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (12). Tilstedeværelsen af brystvorter/areolae hos hanunger kontrolleres på PND 12 eller 13.

46. Alle udvalgte F_1-unger vurderes dagligt for balano-præputial separation eller åbning af vagina for henholdsvis hanner og hunner, og vurderingen begynder før den dag, hvor disse endepunkter forventes nået, for at konstatere, om kønsmodningen indtræder tidligt. Evt. abnormiteter i kønsorganer såsom vedvarende vaginaltråd, hypospadia eller spaltet penis noteres. F_1-dyrs kønsmodenhed sammenlignes med fysisk udvikling ved at bestemme alder og kropsvægt ved balano-præputial separation eller åbning af vagina for henholdsvis hanner og hunner (13).

Vurdering af potentiel udviklingsneurotoksicitet (kohorte 2A og 2B)

47. 10 hanner og 10 hunner i kohorte 2A og 10 hanner og 10 hunner i kohorte 2B fra hver behandlingsgruppe (for hver kohorte: én han eller én hun pr. kuld, idet alle kuld repræsenteres af mindst én vilkårligt udvalgt unge) anvendes til neurotoksicitetsvurderinger. Kohorte 2A-dyr underkastes auditiv startle, 'functional observational battery', motorisk aktivitet (se pkt. 48-50) og neuropatologiske vurderinger (se pkt. 74-75). Man skal bestræbe sig på at sikre, at variationer i alle testbetingelser er minimale og ikke systematisk relateres til behandlingen. Blandt variabler, som kan påvirke adfærden, er lydstyrke (f.eks. intermitterende støj), temperatur, luftfugtighed, belysning, lugte, tidspunkt på dagen og forstyrrelser fra

▼M5

omgivelserne. Resultater af neurotoksicitetsassays fortolkes i forhold til relevante tidligere kontrolreferenceintervaller. Kohorte 2B-dyr anvendes til neuropatologisk vurdering på PND 21 eller PND 22 (se pkt. 74-75).

48. En auditiv startle-test udføres på PND 24 (± 1 dag) under anvendelse af dyr i kohorte 2A. Testdagen afbalanceres med behandlings- og kontrolgrupper. Hver session består af 50 forsøg. Ved udførelse af den auditive startle-test bestemmes den gennemsnitlige responsamplitude på hver blok a 10 forsøg (fem blokke a 10 forsøg), idet testbetingelserne optimeres, så der skabes tilvænning inden for den enkelte session. Disse procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.53 (35).

49. På et passende tidspunkt mellem PND 63 og PND 75 underkastes kohorte 2A-dyrene et 'functional observational battery' og en automatiseret test af motorisk aktivitet. Disse procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.43 (33) og B.53 (35). 'Functional observational battery' omfatter en grundig beskrivelse af forsøgsdyrets udseende, adfærd og funktionsmæssige integritet. Dette vurderes gennem observationer i dyrets eget bur, efter fjernelse til et standardareal til observation (åbent felt), hvor dyret bevæger sig frit, og gennem manipulationstest. Progressionen går fra den mindst til den mest interaktive test. En liste over målinger er anført i tillæg 1. Alle dyr observeres nøje af uddannede observatører, som ikke kender dyrenes behandlingsstatus og følger standardiserede procedurer for at minimere variabilitet, som skyldes observatørerne. Hvor det er muligt, anbefales det, at den samme observatør vurderer dyrene i en given test. Hvis det ikke er muligt, skal det påvises, at der er en vis pålidelighed mellem observatørerne. For hver parameter i gruppen af adfærdstest anvendes der eksplicitte operationelt definerede bedømmelseskriterier og -skalaer. Om muligt udvikles der objektive kvantitative mål for observationsendepunkter, der omfatter subjektiv rangordning. Med hensyn til motorisk aktivitet testes hvert dyr individuelt. Testsessionen skal være lang nok til at påvise kontroldyrenes tilvænning inden for den enkelte session. Motorisk aktivitet overvåges af et automatisk aktivitetsregistrerende apparat, som skal kunne afsløre både stigninger og fald i aktiviteten (dvs. at referenceaktiviteten som målt af anordningen ikke må være så lav, at fald ikke afsløres, og heller ikke så høj, at aktivitetsstigninger ikke registreres). Hver anordning testes efter standardprocedurer for så vidt muligt at sikre operationens pålidelighed på tværs af anordninger og dage. Så vidt muligt skal behandlingsgrupperne være ligeligt fordelt over anordningerne. Behandlingsgrupper udlignes på tværs af testgange for at undgå sammenblanding af cirkadiske aktivitetsrytmer.

50. Såfremt eksisterende information viser behov for andre funktionstest (f.eks. sensorisk, social, kognitiv), integreres disse uden at skade integriteten af de øvrige evalueringer, som foretages i undersøgelsen. Hvis testen udføres med de samme dyr, som bruges til standard auditiv startle, functional observational battery og test af motorisk aktivitet, fastsættes der forskellige test for at minimere risikoen for at skade integriteten af disse test. Supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer, forventede virkninger eller virkningsmekanisme/virkemåde peger på neurotoksicitet af en bestemt art.

▼M5

Vurdering af potentiel udviklingsimmunotoksicitet (kohorte 3)

51. På PND 56 (± 3 dage) anvendes 10 hanner og 10 hunner i kohorte 3 fra hver behandlingsgruppe (én han eller én hun pr. kuld, alle kuld repræsenteret med mindst én unge, vilkårligt udvalgt) i et T-celleafhængigt antistofresponsassay, dvs. den primære IgM-antistofrespons på et T-celleafhængigt antigen såsom røde blodlegemer fra får (Sheep Red Blood Cells, SRBC) eller Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), i overensstemmelse med aktuelle immunotoksicitetstestprocedurer (14) (15). Reaktionen kan evalueres ved at tælle specifikke plaquedannende celler (plaque-forming cells — PFC) i milten eller ved at bestemme SRBC- eller KLH-specifikt IgM-antistoftiter i serummet gennem ELISA ved maksimal respons. Reaktionerne topper typisk fire (PFC-respons) eller fem (ELISA) dage efter intravenøs immunisering. Hvis den primære antistofrespons analyseres ved at tælle plaquedannende celler, er det tilladt at evaluere undergrupper af dyr på forskellige dage, forudsat at tidspunkterne for undergruppens immunisering og aflivning er fastsat således, at PFC'er tælles ved den maksimale respons, undergrupperne indeholder lige mange han- og hununger fra alle dosisgrupper, herunder kontrolgrupper, og undergrupperne evalueres ved omtrent samme alder efter fødslen (PND). Eksponering for testkemikaliet vil fortsætte, indtil dagen før miltene indsamles med henblik på PFC-respons eller serum til ELISA-assayet.

Opfølgende vurdering af potentiel reproduktionstoksicitet (kohorte 1B)

52. Kohorte 1B-dyr kan fastholdes i behandling ud over PND 90 og bruges til avl for at få en F_2-generation, hvis det er nødvendigt. Hanner og hunner fra samme dosisgruppe anbringes sammen (idet det undgås at parre søskende) i op til to uger fra eller efter PND 90, men ikke efter PND 120. Procedurerne er de samme som for P-dyr. Dog kan det på grundlag af 'weight of evidence' være tilstrækkeligt at aflive kuldene på PND 4 i stedet for at følge dem til fravænning eller senere.

AFSLUTTENDE OBSERVATIONER

Klinisk biokemi/hæmatologi

53. Systemiske virkninger overvåges hos P-dyrene. Fastende blodprøver fra et bestemt sted tages fra 10 vilkårligt udvalgte P-hanner og -hunner pr. dosisgruppe ved undersøgelsens afslutning, opbevares under passende betingelser og underkastes delvis eller fuldstændig hæmatologisk undersøgelse, klinisk-biokemisk undersøgelse, assay af T4 og TSH eller andre undersøgelser i henhold til den kendte virkningsprofil for testkemikaliet (se OECD's vejledning 151 (40)). Følgende hæmatologiske parametre undersøges: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og koaguleringstid/-evne. Undersøgelser af plasma eller serum omfatter: glukose, total cholesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Målinger af yderligere enzymer og galdesyrer kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger. Der kan desuden tages blodprøver fra alle dyr, som opbevares til mulig analyse på et senere tidspunkt for yderligere at afklare usikre virkninger eller generere interne eksponeringsdata. Såfremt der ikke er planer om en anden parring af P-dyr, tages blodprøverne lige før eller som en del af proceduren ved den fastsatte aflivning. Hvis dyr beholdes, tages blodprøver, et par dage før dyrene parres for anden gang. Medmindre eksisterende data fra undersøgelser med gentagen dosis viser, at parameteren ikke påvirkes af testkemikaliet, udføres urinanalyse forud for afslutningen af undersøgelsen, og følgende parametre evalueres: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose, blod og

▼M5

blodceller, cellerester. Urin kan også opsamles for at overvåge udskillelsen af testkemikaliet og/eller metabolitter.

54. Systemiske virkninger overvåges også hos F_1-dyrene. Fastende blodprøver fra et bestemt sted tages fra 10 vilkårligt udvalgte kohorte 1A-hanner og -hunner pr. dosisgruppe ved afslutningen, opbevares under passende betingelser og underkastes standardklinisk-biokemisk undersøgelse, herunder vurdering af serumniveauer for skjoldbruskkirtelhormoner (T4 og TSH), hæmatologisk undersøgelse (total og differential leucocyttælling plus erythrocyttælling) og urinanalyse.

55. Overskydende unger på PND 4 underkastes makroskopisk obduktion, og det overvejes at måle serumthyroidhormonkoncentrationer (T4). Om nødvendigt kan neonatalt (PND 4) blod samles efter kuld til biokemiske undersøgelser/thyroidhormonanalyser. Blod samles også til T4- og TSH-analyse fra fravænnede individer, som underkastes makroskopisk obduktion på PND 22 (F_1-unger, der ikke er valgt til kohorter).

Spermaparametre

56. Spermaparametre måles hos alle P-generationshanner, medmindre eksisterende data viser, at spermaparametrene er upåvirkede i en 90-dagesundersøgelse. Undersøgelse af spermaparametre udføres for alle kohorte 1A-hanner.

57. Ved afslutningen registreres testis- og epididymis-vægt for alle P- og F_1-(kohorte 1A) hanner. Mindst én testis og én epididymis udtages til histopatologisk undersøgelse. De resterende eksemplarer af epididymis anvendes til tælling af spermiebeholdning i cauda epididymidis (16) (17). Endvidere opsamles sperma fra cauda epididymidis (eller vas deferens) efter metoder, som minimerer skaden, til vurdering af spermiemotilitet og -morfologi (18).

58. Spermiemotilitet kan enten vurderes straks efter aflivning eller registreres til senere analyse. Procentdelen af fremadbevægelige (progressivt motile) spermier bestemmes enten subjektivt eller objektivt gennem computerassisteret motilitetsanalyse (19) (20) (21) (22) (23) (24). Til bedømmelse af spermiemorfologi undersøges en spermaprøve fra epididymis (eller vas deferens) som fikserede eller våde præparater (25) og med mindst 200 spermatozoer pr. prøve klassificeret som enten normale (både hoved og midterstykke/hale ser normale ud) eller anormale. Som eksempel på morfologiske spermieabnormiteter kan nævnes sammensmeltning, isoleret hoved og misdannet hoved og/eller hale (26). Misdannede eller store spermahoveder kan være tegn på defekter i spermiationen.

59. Hvis spermaprøver fryses, udstrygninger fikseres, og billeder til spermamotilitetsanalyse registreres ved obduktionen (27), kan efterfølgende analyse begrænses til hanner i kontrol- og højdosisgrupperne. Observeres der imidlertid behandlingsrelaterede virkninger, vurderes de lavere dosisgrupper også.

▼M5

Makroskopisk obduktion

60. Ved testens afslutning eller for tidlig død obduceres alle P- og F_1-dyr og undersøges makroskopisk for evt. strukturabnormiteter eller patologiske forandringer. Særlig opmærksomhed rettes mod kønsorganerne. Unger, som aflives af humane grunde i moribund tilstand, samt døde unger registreres og undersøges, når de ikke er opløst, for evt. defekter og/eller dødsårsag og præserveres.

61. For voksne P- og F_1-hunner undersøges et vagina-smear på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af kønsorganerne. På alle P-hunner (og evt. F_1-hunner) undersøges uterus på en måde, som ikke vanskeliggør histopatologisk bedømmelse, for tilstedeværelse af og antal implantationssteder.

Organvægt og vævspræservering — P- og voksne F_1-dyr

62. Ved testens afslutning bestemmes kropsvægt og vådvægt af alle nedenfor anførte organer fra alle P-dyr og alle voksne F_1-dyr fra relevante kohorter (anført nedenfor) snarest muligt efter dissektion for at undgå udtørring. Disse organer præserveres herefter under passende betingelser. Medmindre andet er anført, kan parrede organer vejes enkeltvis eller sammen i overensstemmelse med det udførende laboratoriums sædvanlige praksis.

— Uterus (med æggeledere og cervix), ovarier

— testes, epididymides (total og cauda for prøverne, som anvendes til spermatælling)

— prostata (dorsolateral og ventral del sammen). Man skal være forsigtig ved rensning af prostatakomplekset for at undgå at punktere de væskefyldte vesiculae seminales. I tilfælde af en behandlingsrelateret virkning på den samlede prostatavægt dissekeres de dorsolaterale og ventrale segmenter omhyggeligt efter fiksering og vejes separat

— vesiculae seminales med prostata anterior og deres væsker (som én enhed)

— hjerne, lever, nyrer, hjerte, milt, thymus, hypofyse, skjoldbruskkirtel (efter fiksering), binyrer og kendte målorganer eller -væv.

63. Ud over de her anførte organer præserveres prøver af perifer nerve, muskel, rygmarv, øje plus synsnerve, mave-tarmkanal, urinblære, lunge, spiserør (med vedhæftet skjoldbruskkirtel og biskjoldbruskkirtel), knoglemarv, vas deferens (hanner), brystkirtler (hanner og hunner) og vagina under passende betingelser.

64. Alle organer fra kohorte 1A-dyr vejes og præserveres til histopatologisk undersøgelse.

65. Til undersøgelse af immunotoksiske virkninger fremkaldt før eller efter fødslen underkastes 10 hanner og 10 hunner fra kohorte 1A fra hver behandlingsgruppe (én han og én hun pr. kuld, idet alle kuld repræsenteres med mindst én vilkårligt udvalgt unge) følgende undersøgelser:

— vejning af lymfeknuder i tilknytning til og med afstand til eksponeringsvejen (ud over vejningen af binyrerne, thymus og milt, der allerede er udført for alle kohorte 1A-dyr)

▼M5

— analyse af splenisk lymfocytsubpopulation (CD4+ og CD8+ T-lymfocytter, B-lymfocytter og naturlige dræberceller) under anvendelse af halvdelen af milten, idet den anden halvdel af milten præserveres til histopatologisk bedømmelse.

En analyse af spleniske lymfocytsubpopulationer i ikkeimmuniserede dyr (kohorte 1A) vil afgøre, om eksponeringen hænger sammen med et skifte i den immunologiske ligevægtsfordeling af »hjælper«- (CD4+) eller cytotoksiske (CD8+) thymusderiverede lymfocytter eller naturlige dræber- (NK) celler (hurtige reaktioner på neoplastiske celler og patogener).

66. Følgende organer fra kohorte 1B-dyr vejes, og tilsvarende væv præserveres til bloktrinnet:

— vagina (ikke vejet)

— uterus med cervix

— ovarier

— testes (mindst én)

— epididymides

— vesiculae seminales og prostata anterior

— prostata

— hypofyse

— identificerede målorganer.

Der foretages histopatologisk undersøgelse i kohorte 1B, hvis resultaterne fra kohorte 1A er usikre, eller i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer.

67. Kohorte 2A og 2B: Udviklingsneurotoksicitetstest (PND 21 eller PND 22 og voksent afkom). Kohorte 2A-dyr aflives efter adfærdstest med registrering af hjernevægt og fuldstændig neurohistopatologisk undersøgelse med henblik på neurotoksicitetsvurdering. Kohorte 2B-dyr aflives på PND 21 eller PND 22 med registrering af hjernevægt og mikroskopisk undersøgelse af hjernen med henblik på neurotoksicitetsvurdering. Perfusionsfiksering er nødvendig for kohorte 2A-dyr og valgfri for kohorte 2B-dyr, jf. testmetode B.53 (35).

Organvægt og vævspræservering — fravænnede F_1-dyr

68. Unger, som ikke er udvalgt til kohorter, herunder små uudviklede unger, aflives efter fravænning på PND 22, medmindre resultaterne viser behov for yderligere undersøgelser i levende live. Aflivede unger underkastes makroskopisk obduktion, herunder en vurdering af kønsorganerne, jf. pkt. 62 og 63. For op til 10 unger pr. køn pr. gruppe fra så mange kuld som muligt vejes hjerne, milt og thymus og opbevares under passende betingelser. Endvidere kan brystvæv for disse han- og hununger præserveres til videre mikroskopisk analyse ([1]) (se OECD's vejledning 151 (40)). Større anomalier og målvæv gemmes til evt. histologisk undersøgelse.

([1]) Forskning har vist, at brystkirtlen, især under udviklingen i de tidlige livsstadier, er et følsomt endepunkt for østrogenaktivitet. Det anbefales at medtage endepunkter, som involverer brystkirtler fra unger af begge køn, i denne testmetode, når den valideres.

▼M5

Histopatologi — P-dyr

69. En fuldstændig histopatologisk undersøgelse af alle organer anført i pkt. 62 og 63 udføres for alle P-dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. De organer, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, undersøges ligeledes for alle dyr fra lavdosisgrupperne som led i fastsættelsen af NOAEL. Derudover omfatter den histopatologiske undersøgelse kønsorganerne fra alle dyr, som mistænkes for nedsat fertilitet, fordi de f.eks. ikke har været i stand til at parre sig, undfange, besvangre eller føde rask afkom, eller hvis brunstcyklus, spermietal, -motilitet eller -morfologi var påvirket, samt alle makroskopiske forandringer.

Histopatologi — F_1-dyr

Kohorte 1-dyr

70. En fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organerne anført i pkt. 62 og 63 udføres for alle voksne kohorte 1-dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Alle kuld skal være repræsenteret med mindst én unge pr. køn. De organer og væv, som udviser behandlingsrelaterede forandringer og alle makroskopiske læsioner, undersøges ligeledes for alle dyr fra lavdosisgrupperne som led i fastsættelsen af NOAEL. Til bedømmelse af virkninger fremkaldt før eller efter fødslen på lymfoide organer foretages også en histopatologisk undersøgelse af indsamlede lymfeknuder og knoglemarv fra 10 hanner og 10 hunner i kohorte 1A ved siden af den histopatologiske undersøgelse af thymus, milt og binyrer, som allerede er udført på alle 1A-dyr.

71. Der foretages en histopatologisk undersøgelse af reproduktions- og endokrint væv fra alle kohorte 1B-dyr behandlet til bloktrinnet som beskrevet i pkt. 66 i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer. Er resultaterne fra kohorte 1A usikre, foretages også en histologisk undersøgelse af kohorte 1B.

72. Ovarier fra voksne hunner skal indeholde primordial- og voksende follikler foruden corpora lutea. Derfor sigter den histopatologiske undersøgelse mod en kvantitativ vurdering af primordial- og voksende follikler foruden corpora lutea i F_1-hunner. Antallet af dyr, valg af ovariesnit og størrelsen af prøvesnit skal være statistisk tilpasset den anvendte vurderingsmetode. En follikeltælling kan først foretages på kontrol- og højdosisdyr, og ved skadevirkning hos sidstnævnte undersøges lavere dosisgrupper. Undersøgelsen skal omfatte en optælling af primordialfollikler, hvilket kan kombineres med optælling af små voksende follikler, med henblik på sammenligning af ovarierne i behandlings- og kontrolgrupper (se OECD's vejledning 151 (40)). Vurdering af corpora lutea foretages parallelt med test for brunstcyklus, så der kan tages hensyn til cyklusstadiet i vurderingen. Æggeleder, uterus og vagina undersøges for passende organtypisk udvikling.

73. Detaljerede histopatologiske undersøgelser af testiklerne foretages på F_1-hanner for at identificere behandlingsrelaterede virkninger på testisdifferentiering og -udvikling samt på spermatogenesen (38). Når det er muligt, undersøges snit af rete testis. Caput, corpus og cauda fra epididymis og vas deferens undersøges for passende organtypisk udvikling og for de krævede parametre for P-hanner.

▼M5

Kohorte 2-dyr

74. Neurohistopatologiske undersøgelser foretages for alle højdosis- og kontroldyr i kohorte 2A pr. køn efter fuldførelse af neuroadfærdstest (efter PND 75, men ikke efter PND 90). Histopatologisk undersøgelse af hjernen foretages for alle højdosis- og kontroldyr i kohorte 2B pr. køn på PND 21 eller PND 22. De organer eller væv, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, skal ligeledes undersøges for dyr fra lavere dosisgrupper som led i fastsættelsen af NOAEL. For kohorte 2A- og 2B-dyr undersøges mange snit fra hjernen, så det er muligt at undersøge bulbus olfactorius, cortex cerebralis, hippocampus, basalganglier, thalamus, hypothalamus, midterhjernen (tectum, tegmentum og pedunculus cerebri), hjernestamme og cerebellum. Kun for kohorte 2A undersøges øjne (retina og synsnerve) og prøver af perifer nerve, muskel og rygmarv. Alle neurohistologiske procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.53 (35).

75. Morfometriske (kvantitative) vurderinger foretages på repræsentative områder af hjernen (homologe snit nøje udvalgt på grundlag af pålidelige mikroskopiske kendetegn) og kan omfatte lineære målinger og/eller arealmålinger af specifikke hjerneregioner. Der tages mindst tre på hinanden følgende snit ved hvert kendetegn (niveau) for at vælge det mest homologe og repræsentative snit for det specifikke hjerneområde, der skal vurderes. Neuropatologen skal udvise passende dømmekraft med hensyn til, om snit forberedt til måling er homologe med andre i prøvesættet og derfor egnede til indgå i det, eftersom især lineære målinger kan ændre sig over en relativt kort afstand (28). Snit, som ikke er homologe, bruges ikke. Målet er at udtage prøver fra alle dyr, der er udtaget til det formål (10/køn/dosisniveau), men mindre antal kan dog stadig være tilstrækkeligt. Imidlertid vil prøver fra færre end seks dyr/køn/dosisniveau normalt ikke blive anset for tilstrækkeligt til denne testmetodes formål. Stereologi kan anvendes til at identificere behandlingsrelaterede virkninger på parametre såsom volumen eller celleantal til bestemte neuroanatomiske områder. I forbindelse med alle aspekter af præpareringen af vævsprøver, fra vævsfiksering over dissektion af vævsprøver og vævspræparering til farvning på objektglas, følges et afbalanceret design, således at hver batch indeholder repræsentative prøver fra hver dosisgruppe. Når der skal bruges morfometriske eller stereologiske analyser, indlejres hjernevævet i et passende medium ved alle dosisniveauer samtidig for at undgå de skrumpningsartefakter, der kan optræde i forbindelse med langvarig opbevaring i fiksativ.

RAPPORTERING

Data

76. Data rapporteres individuelt og opsummeres i tabelform. For hver testgruppe og hver generation rapporteres følgende, hvor det er relevant: antal dyr ved testens begyndelse, antal dyr fundet døde under testen eller aflivet humant, tidspunkt for død eller human aflivning, antal frugtbare dyr, antal drægtige hunner, antal hunner, som har født et kuld, og antal dyr, der viser tegn på toksicitet. En beskrivelse af toksiciteten samt tidspunktet for de toksiske virkningers indtræden, varighed og sværhedsgrad medtages også.

77. Numeriske resultater vurderes efter en relevant og accepteret statistisk metode. De statistiske metoder vælges som en del af undersøgelsesdesignet og skal på passende vis behandle ikkenormale data (f.eks. optællingsdata), censurerede data (f.eks. begrænset observationstid), ikke uafhængige (f.eks. kuldeffekter og gentagne målinger) samt ulige varianser. Generaliserede lineære blandede modeller og dosisresponsmodeller dækker en bred klasse af analytiske værktøjer, som kan være relevante for data genereret under denne testmetode. Rapporten skal indeholde tilstrækkelig information om

▼M5

analysemetoden og det anvendte computerprogram, til at en uafhængig rapportør/statistiker kan vurdere/revurdere analysen.

Vurdering af resultater

78. Fundene vurderes med hensyn til de observerede virkninger, bl.a. obduktion og mikroskopiske fund. Vurderingen omfatter sammenhængen — eller manglen herpå — mellem dosis og tilstedeværelse, forekomst og sværhedsgrad af anomalier, bl.a. makroskopiske læsioner. Målorganer, fertilitet, kliniske anomalier, reproduktions- og yngleprestationer, ændringer i kropsvægt, mortalitet og evt. andre toksiske eller udviklingsmæssige virkninger vurderes også. Særlig opmærksomhed rettes mod kønsspecifikke forandringer. Testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og evt. TK-data, herunder placentaoverførsel og mælkeudskillelse, inddrages i vurderingen af testresultaterne.

Testrapport

79. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, der er fremkommet i denne undersøgelse fra P- og F_1-dyr samt F_2-dyr (hvor det er relevant).

Testkemikalie

— alle relevante tilgængelige oplysninger om testkemikaliets kemiske, toksikokinetiske og toksikodynamiske egenskaber

— identifikationsoplysninger

— renhed.

Evt. vehikel

— begrundelse for valg af vehikel (hvis det er andet end vand).

Forsøgsdyr

— anvendt art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, redematerialer osv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse

— vaginaludstrygning for P-hunner før behandlingens påbegyndelse (hvis der indsamles data på det tidspunkt)

— parringsoptegnelser for P-generationen med angivelse af, hvilke hanner og hunner der er parret med hinanden, og parringssucces

— optegnelser over, hvilket kuld voksne F_1-generationsdyr er fra.

Testbetingelser

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om testkemikaliets formulering/fodertilberedning, opnåede koncentrationer

▼M5

— tilberedningens stabilitet og homogenitet i vehikel eller bærer (f.eks. kost, drikkevand), i blod og/eller mælk under anvendelsesbetingelserne og opbevaring mellem anvendelser

— oplysninger om indgift af testkemikaliet

— omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag), hvis det er relevant

— oplysninger om foder- og vandkvalitet (herunder kostsammensætning, hvis oplysningerne foreligger)

— detaljeret beskrivelse af randomiseringsprocedurer for udvælgelse af unger til aflivning og tilordning af unger til testgrupper

— miljøbetingelser

— liste over forsøgsmedarbejdere, bl.a. uddannelse.

Resultater (resumé og individuelle data efter køn og dosis)

— foderindtagelse, evt. vandindtagelse, foderudnyttelse (kropsvægtforøgelse pr. gram indtaget foder bortset fra perioden, hvor dyrene har været sammen, og under laktation) og indtagelse af testkemikalie (for indgift i foder/drikkevand) for P- og F_1-dyr

— absorptionsdata (evt.)

— kropsvægtdata for P-dyr

— kropsvægtdata for udvalgte F_1-dyr efter fravænning

— dødstidspunkt under testen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— data om hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser samt urinanalyse, bl.a. TSH og T4

— fænotypisk analyse af miltceller (T-, B-, NK-celler)

— knoglemarvens cellularitet

— data om toksisk respons

— antal P- og F_1-hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklusvarighed

— tid til parring (prækoitalt interval, antal dage mellem den dag, dyrene sættes sammen, og den faktiske parring)

— toksiske eller andre virkninger på reproduktion, herunder antal og procentdele dyr, som fuldførte parring, drægtighed, fødsel og laktation af hanner, der fremkaldte drægtighed, af hunner med tegn på dystoki/langvarig eller vanskelig fødsel

— varighed af drægtighed og evt. fødsel

— antal implantater, kuldstørrelse og procentdel hanunger

— antal og procentdel postimplantationstab, levende fødsler og dødfødsler

▼M5

— vægtdata for kuld og unger (hanner, hunner og begge), antal små uudviklede unger, hvis de er optalt

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter

— toksiske virkninger på afkom, postnatal vækst, levedygtighed osv.

— data vedrørende fysiske kendetegn hos unger og andre data vedrørende den postnatale udvikling

— data om F_1-dyrenes kønsmodning

— i det omfang det er relevant, data vedrørende iagttagelser af funktioner hos unger og voksne

— kropsvægt ved aflivning og absolut og relativ organvægt for P-dyr og voksne F_1-dyr

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— totalt antal spermier i cauda epididymis, procentdel progressivt motile spermier, procentdel morfologisk normale spermier og procentdel spermier med hver af de fundne abnormiteter for P- og F_1-hanner

— antal follikler i P- og F_1-hunners ovarier og deres modningsstadie, hvor det er relevant

— optælling af corpora lutea i F_1 -hunners ovarier

— statistisk behandling af resultaterne, når det er relevant.

Kohorte 2-parametre

— en detaljeret beskrivelse af procedurer anvendt til at standardisere observationer og procedurer samt operationelle definitioner for bedømmelse af observationer

— en liste over alle anvendte testprocedurer og begrundelse for anvendelsen heraf

— oplysninger om de anvendte adfærdsmæssige/funktionelle, neuropatologiske og morfometriske procedurer, herunder oplysninger og detaljer om automatiserede anordninger

— procedurer for kalibrering og sikring af anordningernes ækvivalens og afbalancering af behandlingsgrupper i testprocedurer

— kort begrundelse for evt. beslutninger baseret på faglig vurdering

— detaljeret beskrivelse af alle adfærdsmæssige, funktionelle, neuropatologiske og morfometriske fund efter køn og dosisgruppe, herunder både stigninger og fald i forhold til kontrolgrupper

— hjernevægt

— evt. diagnoser udledt af neurologiske tegn og læsioner, herunder naturligt forekommende sygdomme eller tilstande

— billeder af eksemplariske fund

— 'low-power'-billeder til at vurdere homologien af snit anvendt til morfometri

▼M5

— statistisk behandling af resultater, herunder statistiske modeller anvendt til analyse af data og resultater, uanset om de var signifikante eller ej

— evt. andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende testkemikaliets neurotoksiske potentiale fordelt på køn og dosisgruppe

— evt. toksikokinetiske oplysningers indvirkninger på konklusionerne

— data, der støtter testmetodens pålidelighed og følsomhed (dvs. positive og tidligere kontroldata)

— evt. sammenhæng mellem neuropatologiske og funktionelle virkninger

— NOAEL- eller benchmarkdosis for moderdyr og afkom fordelt på køn og dosisgruppe

— diskussion af den samlede datafortolkning baseret på resultaterne, herunder en konklusion om, hvorvidt kemikaliet forårsagede udviklingsneurotoksicitet og NOAEL.

Kohorte 3-parametre

— serum-IgM-antistoftiter (sensibilisering over for SRBC eller KLH) eller spleniske IgM-PFC-enheder (sensibilisering over for SRBC)

— TDAR-metodens effektivitet bekræftes som led i optimeringsprocessen for laboratorier, der foretager analysen første gang, og periodisk (f.eks. årligt) for alle laboratorier

— diskussion af den samlede datafortolkning baseret på resultaterne, herunder en konklusion om, hvorvidt kemikaliet forårsagede udviklingsimmunotoksicitet og NOAEL.

Diskussion af resultater

Konklusioner, herunder NOAEL-værdier for virkninger på forældre og afkom

Alle oplysninger, som ikke er fremkommet under undersøgelsen, men er nyttige for fortolkningen af resultaterne (f.eks. virkningernes ligheder med kendte neurotoksiske stoffer), anføres også.

Fortolkning af resultater

80. En udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation vil om nødvendigt give information om virkningerne af gentagen eksponering for et kemikalie i alle faser af reproduktionscyklussen. Navnlig giver undersøgelsen information om forplantningssystemet og om endepunkter vedrørende afkommets udvikling, vækst, overlevelse og funktioner indtil PND 90.

81. Ved fortolkning af undersøgelsens resultater tages der hensyn til alle tilgængelige oplysninger om kemikaliet, bl.a. fysisk-kemiske, TK- og toksikodynamiske egenskaber, tilgængelige relevante oplysninger om strukturelt beslægtede stoffer og resultater af tidligere gennemførte toksicitetsundersøgelser med testkemikaliet (f.eks. akut toksicitet, toksicitet efter gentagen anvendelse, mekanistiske undersøgelser og undersøgelser til vurdering af, om der er betydelige kvalitative og kvantitative artsforskelle i metaboliske egenskaber in vivo-/in vitro). Resultaterne af den makroskopiske obduktion og organvejningen sammenholdes med observationer fra andre undersøgelser med gentagen dosering, når det er praktisk muligt. Fald i væksten hos afkom kan sammenholdes med testkemikaliets påvirkning af mælkens sammensætning (29).

▼M5

Kohorte 2 (udviklingsneurotoksicitet)

82. Neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske resultater fortolkes i forbindelse med alle fund efter en 'weight-of-evidence'-tilgang med ekspertvurdering. Evt. mønstre i adfærdsmæssige eller morfologiske fund samt tegn på dosisrespons diskuteres. Evalueringen af udviklingsneurotoksicitet, bl.a. humanepidemiologiske undersøgelser eller caserapporter og undersøgelser med dyreforsøg (f.eks. toksikokinetiske data, oplysninger om struktur/aktivitet, data fra andre toksicitetsundersøgelser), medtages i denne karakterisering. Evalueringen af data skal indeholde en diskussion af både biologisk og statistisk signifikans. Evalueringen skal indeholde en evt. sammenhæng mellem observerede neuropatologiske og adfærdsmæssige forandringer. Med hensyn til vejledning om fortolkning af udviklingsneurotoksicitetsresultater henvises til testmetode B.53 (35) og Tyl et al., 2008 (31).

Kohorte 3 (udviklingsimmunotoksicitet)

83. Undertrykkelse eller styrkelse af immunfunktionen som vurderet gennem TDAR (T-celleafhængig antistofrespons) vurderes i forbindelse med alle iagttagelser. TDAR-resultatets signifikans kan underbygges af andre virkninger på immunologisk relaterede indikatorer (f.eks. knoglemarvens cellularitet, vægt og histopatologiske undersøgelser af lymfevæv, lymfocyt subset distribution). Virkninger fastslået ved TDAR kan være mindre meningsfulde, i tilfælde af at andre toksiciteter observeres ved lavere eksponeringskoncentrationer.

84. Med hensyn til fortolkningen af reproduktions- og neurotoksicitetsresultater henvises til OECD's vejledning 43 (26).

LITTERATUR

1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006). 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', Critical Reviews in Toxicology, 36, 69-98.

2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999). 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', Lab. Anim. Sci., 49, 530- 536.

3) Zoetis, T. and I. Walls (2003). Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005). 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999). 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', Toxicological Sciences, 49, 1-4.

6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995). 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', Journal of the American College of Toxicologists, 14, 293-327.

7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003). 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37, 356-369.

▼**M5**

8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', Journal of Toxicological Sciences, 25, 1-21.

9) Creasy, D.M. (2003). 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', Birth Defects Research, Part B, 68, 408-415.

10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007). 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

11) Sadleir, R.M.F.S. (1979). 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999). 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977). 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', Biological Reproduction, 17, 298-303.

14) Ladics, G.S. (2007). 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', Methods, 41, 9-19.

15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004). 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', Toxicology, 197, 23-35.

16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989). 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', Fundamental and Applied Toxicology, 12, 92-108.

17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978). 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', Journal of Reproduction and Fertility, 54, 103-107.

18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991). 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. Reproductive Toxicology, 5, 39-44.

19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996). 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', Reproductive Toxicology, 10, 237- 244.

20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992). 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', Reproductive Toxicology, 6, 267-273.

21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992). 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration', Journal of Andrology, 13, 409-421.

22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991). 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', Reproductive Toxicology, 5, 449-458.

▼**M5**

23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993). 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida, s. 319-333.

24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989). 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', Journal of Andrology, 10, 401-415.

25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992). 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', Reproductive Toxicology, 6, 491-505.

26) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27) Working, P.K., M. Hurtt (1987). 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', Journal of Andrology, 8, 330-337.

28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006). 'A Best Practices Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', Toxicological Pathology, 34, 296-313.

29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006). 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', Food Chemicals Toxicology, 44, 8-16.

30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007). 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', Environmental health perspectives, 115(12), 1717-1726.

31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008). 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', Neurotoxicology and Teratology, 30: 349-381.

32) OECD (1996). Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33) Kapitel B.43 i dette bilag, Neurotoksicitetsundersøgelse i gnavere

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

35) Kapitel B.53 i dette bilag, Udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse

36) Kapitel B.54 i dette bilag, Uterotrofisk bioassay med gnavere: en korttidsscreeningtest for østrogene egenskaber

37) Kapitel B.55 i dette bilag, Hershberger-bioassay med rotter: et korttidsscreeningassay for (anti)androgene egenskaber

▼**M5**

38) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

39) OECD (2011). Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40) OECD (2013). Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Tillæg 1

Målinger og observationer medtaget i 'functional observational battery' (kohorte 2A)

Eget bur og åbent felt	Ved manipulation	Fysiologi
Kropsholdning	Let at flytte	Temperatur
Ufrivillige kloniske eller toniske bevægelser	Let at håndtere	Kropsvægt
Lukning af øjenlåg	Muskeltonus	Pupilrespons
Piloerektion	Respons på tilnærmelse	Pupilstørrelse
Spytflåd	Berøringsrespons	
Tåreflåd	Auditiv respons	
Vokalisationer	Respons på knibning i halen	
Rejse sig op	Opretningsrespons	
Ganganomalier	Valgusfod ved 'landing'	
Vækningstærskel	Gribestyrke i forlemmer	
Stereotypi	Gribestyrke i baglemmer	
Mærkelig adfærd		
Pletter		
Respiratoriske anomalier		

▼**M5**

Tillæg 2

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M5

B.57. **H295R STEROIDSYNTESETESTEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (Test Guideline (TG) 456 (2011)). OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet om revision af eksisterende og udvikling af nye testretningslinjer til screening og test af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier fra 2002 (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) består af fem trin, som hvert svarer til et forskelligt niveau af biologisk kompleksitet(1). I det in vitro-H295R-steroidgenese-assayet (H295R), der er beskrevet i denne testmetode, bruges en human adrenocarcinomcellelinje (NCI-H295R-celler). Der er tale om et niveau 2-in vitro-assay, der tilvejebringer mekanistiske data til brug for screening og prioritering. Udvikling og standardisering af assayet som en screening for kemiske virkninger på steroidgenese, specifikt produktionen af 17β-østradiol (E2) og testosteron (T), blev foretaget i en flertrinsproces. H295R-assayet er blevet optimeret og valideret (2) (3) (4) (5).

2. Formålet med H295R-steroidgenese-assayet er at detektere kemikalier, der påvirker produktion af E2 og T. Formålet med H295R-assayet er at identificere xenobiotika, hvis målsted(er) (target site) er de endogene komponenter, der omfatter den intracellulære biokemiske vej, som begynder med kædereaktionen fra cholesterol til produktionen af E2 og/eller T. Formålet med H295R-assayet er ikke at identificere kemikalier, der påvirker steroidgenese på grund af indvirkning på hypothalamus-hypofyse-gonadal-aksen. Målet med assayet er at finde et ja-nej-svar med hensyn til et kemikalies potentiale til at fremkalde eller reducere produktionen af T og E2. Der kan dog opnås kvantitative resultater i visse tilfælde (se pkt. 53-54). Assayets resultater udtrykkes i relative forandringer i hormonproduktionen sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollerne (SC'er). Målet med assayet er ikke at tilvejebringe specifikke mekanistiske oplysninger om interaktionen mellem testkemikaliet og det endokrine system. Forskning under anvendelse af cellelinjen har haft som formål at identificere virkninger på specifikke enzymer og intermediære hormoner såsom progesteron (2).

3. Definitioner og forkortelser brugt i denne testmetode er beskrevet i bilaget. En detaljeret protokol med instruktioner om, hvordan man fremstiller opløsninger, dyrker celler og gennemfører forskellige af testens aspekter findes i bilag I-III til OECD's dokument 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Fem forskellige enzymer, der katalyserer seks forskellige reaktioner, indgår i biosyntesen af steroide kønshormoner. Enzymatisk omdannelse af cholesterol til pregnenolon ved hjælp af cytochrom-P450 (CYP)-cholesterol-sidekædespaltningsenzymet (CYP11A) udgør det første trin i en række biokemiske reaktioner, der kulminerer i syntesen af steroide slutprodukter. Afhængigt af rækkefølgen af de næste to reaktioner deles den steroidgene vej i to, Δ^5-hydroxysteroid-vejen og Δ^4-ketosteroid-vejen, som samles i produktionen af androstenedion (figur 1).

5. Androstenedion omdannes til testosteron (T) af 17β-hydroxysteroid-dehydrogenase (17β-HSD). Testosteron er både et mellem- og et sluthormonprodukt. Hos hannen kan T omdannes til dihydrotestosteron (DHT) af 5α-reduktase, som findes i cellemembraner, kernemembran og endoplasmatisk retikulum af målvæv med androgen effekt såsom prostata og sædblærer. DHT er meget kraftigere som androgen end T og betragtes også som et sluthormonprodukt. H295R-assayet måler ikke DHT (se pkt. 10).

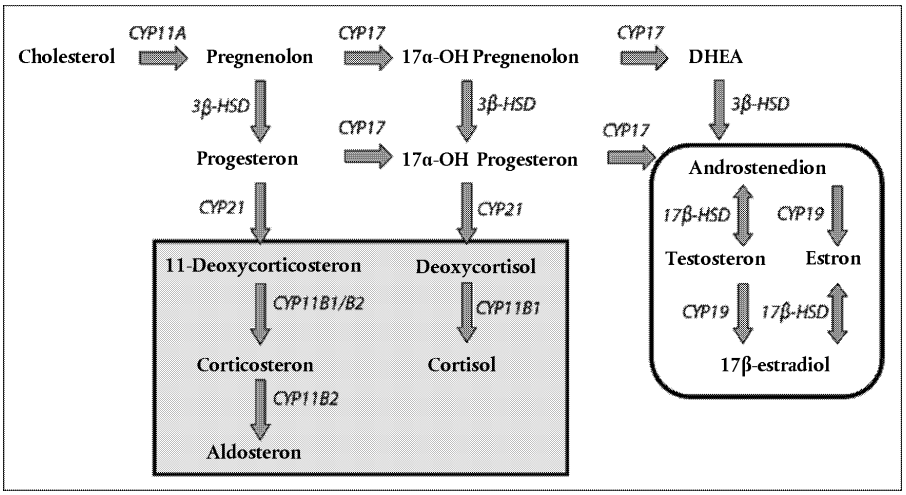
▼M5

6. Det enzym i den steroidgene veje, der omdanner androgene kemikalier til østrogene kemikalier, er aromatase (CYP19). CYP19 omdanner T til 17β-østradiol (E2) og androstenedion til østron. E2 og T betragtes som slutprodukthormoner i den steroidgene vej.

7. Specificiteten af CYP17'-lyaseaktivitet adskiller sig med hensyn til de intermediære substrater fra art til art. Hos mennesket foretrækker enzymet substrater af Δ^5-hydroxysteroid-vejen (pregnenolon), mens substrater i Δ^4-ketosteroid-vejen (progesteron) foretrækkes hos rotter (19). Sådanne forskelle i CYP17-lyaseaktiviteten kan forklare visse artsafhængige forskelle i reaktionen på kemikalier, der ændrer steroidgenese in vivo (6). Det er påvist, at H295-celler er dem, der kommer tættest på at afspejle ekspressionen af adrenalenzym og steroidproduktionsmønstret hos voksne mennesker (20), men er kendt for at udtrykke enzymer for både Δ^5-hydroxysteroid-vejen og Δ^4-ketosteroid-vejen samt for androgensyntese (7) (11) (13) (15).

Figur 1

Steroidgen vej i H295R-celler



NB

Enzymer er markeret med kursiv, hormoner med fede typer, og pile viser syntesens retning. Grå bagrund viser corticosteroid-veje/-produkter. Kønsteroidveje/-produkter er anført i en cirkel. CYP = cytochrom P450, HSD = hydroxysteroid-dehydrogenase, DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Den humane H295R-adreno-carcinomcellelinje er en brugbar in vitro-model til at undersøge effekten på steroidhormonsyntesen (2) (7) (8) (9) (10). H295R-cellelinjen udtrykker gener, der koder for alle de vigtigste enzymer for ovennævnte steroidgenese (11) (15) (figur 1). Dette er en enestående egenskab, fordi in vivo-ekspressionen af disse gener er specifik for væv og udviklingsstadium, hvor et enkelt væv eller enkelt udviklingsstadium typisk ikke udtrykker alle gener, der er involveret i steroidgenese (2). H295R-celler har fysiologiske karakteristika som zonalt udifferentierede adrenalceller hos menneskefostre (11). Cellerne repræsenterer et unikt in vitro-system, idet de har evnen til at producere alle de steroidhormoner, der findes i binyrebarken og kønskirtlerne hos voksne, hvilket gør det muligt at teste for virkninger på både corticosteroid-syntesen og produktionen af kønssteroidhormoner som androgener og østrogener, selv om assayet kun blev godkendt til påvisning af T og E2. Forandringer registreret af testsystemet i form af ændringer i produktionen af T og E2 kan skyldes en lang række forskellige interaktioner mellem testkemikalier og steroidgenfunktioner, der er udtrykt af H295R-cellerne. Disse omfatter modulering af ekspressionen, syntesen eller funktionen af enzymer, der er involveret i produktionen, transformationen eller fjernelsen af steroidhormoner (12) (13) (14). Inhibering af hormonproduktion kan skyldes direkte kompetitiv

▼M5

binding til et enzym i vejen, indvirkning på medvirkende faktorer såsom NADPH (nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) og cAMP (cyklisk adenosinmonophosphat), og/eller forøgelse af steroidmetabolisme eller suppression af genekspression af visse enzymer i den steroidgene vej. Mens inhibering kan være en funktion af både direkte og indirekte processer i hormonproduktionen, er induktion typisk indirekte, idet den f.eks. indvirker på medvirkende faktorer såsom NADPH og cAMP (som i forbindelse med forskolin), sænker steroidmetabolisme (13) og/eller opregulerer den steroidgene genekspression.

9. H295R-assayet har flere fordele:

— Det gør det muligt at påvise både stigninger og fald i produktionen af både T og E2.

— Det gør det muligt direkte at vurdere et kemikalies potentielle indvirkning på cellers levedygtighed/cytotoksicitet. Dette er vigtigt, fordi det gør det muligt at sondre mellem virkninger, der skyldes cytotoksicitet, og virkninger, der skyldes den direkte interaktion mellem kemikalier og steroidgene veje, hvilket ikke er muligt i vævseksplantatsystemer, der består af flere celletyper med varierende sensitivitet og funktionaliteter.

— Det kræver ikke brug af dyr.

— H295R-cellelinjen er kommercielt tilgængelig.

10. Assayets største begrænsninger er følgende:

— Dets metaboliske kapacitet er ukendt, men sandsynligvis ret begrænset. Kemikalier, der skal være metabolisk aktiveret, vil derfor sandsynligvis mangle i dette assay.

— H295R, der er afledt af adrenalvæv, indeholder enzymer, som kan fremstille gluco- og mineralcorticoiderne samt kønshormonerne. Indvirkningen på produktionen af gluco- og mineralcorticoider kan derfor påvirke de T- og E2-niveauer, der er observeret i assayet.

— Det måler ikke DHT og forventes derfor ikke at påvise kemikalier, der hæmmer 5α-reduktase. I så fald kan Hershberger-assayet (16) anvendes.

— H295R-assayet påviser ikke kemikalier, der forstyrrer steroidgenesen ved at påvirke hypothalamus-hypofyse-gonadal-aksen (HPG), da dette kun kan undersøges hos intakte dyr.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Formålet med assayet er påvisning af kemikalier, der påvirker produktionen af T og E2. T er også et mellemprodukt i vejen til produktion af E2. Assayet kan påvise kemikalier, der typisk inhiberer eller inducerer den steroidgene vejs enzymer.

▼M5

12. Assayet gennemføres normalt under almindelige celledyrkningsbetingelser i cellekulturplader med 24 brønde. Alternativt kan der bruges andre pladestørrelser i assayet. Podnings- og forsøgsbetingelser skal dog tilpasses tilsvarende for at sikre overholdelse af ydeevnekriterierne.

13. Efter en akklimatiseringsperiode på 24 timer i multibrøndplader udsættes cellerne i 48 timer for syv koncentrationer af testkemikaliet, mindst in triplo. Opløsningsmiddel og en kendt inhibitor og inducer af hormonproduktion anvendes i en fast koncentration som negative og positive kontroller. Efter eksponeringsperioden fjernes mediet fra hver brønd. Cellelevedygtigheden i hver brønd analyseres umiddelbart efter fjernelsen af mediet. Hormonkoncentrationer i mediet kan måles under anvendelse af forskellige metoder, herunder kommercielt tilgængelige hormonmålekit og/eller instrumentelle teknikker såsom væskekromatografi-massespektometri (LC-MS). Data udtrykkes som foldsændring i forhold til opløsningsmiddelkontrollen og laveste koncentration med observeret effekt (Lowest-Observed-Effect-Concentration (LOEC)). Hvis assayet er negativt, angives den højeste testede koncentration som koncentration uden observeret effekt (No-Observed-Effect-Concentration (NOEC)). Konklusioner vedrørende et kemikalies evne til at påvirke steroidgenese baseres på mindst to uafhængige testkørsler. Den første testkørsel fungerer som en range-finding-kørsel med efterfølgende tilpasning af koncentrationer for kørsel 2 og 3, hvis der opstår problemer med opløselighed eller cytotoksicitet, eller kemikaliets aktivitet ser ud til at være i slutningen af de testede koncentrationsinterval.

DYRKNINGSPROCEDURE

Cellelinje

14. NCI-H295R-cellerne er kommercielt tilgængelige fra American Type Culture Collections (ATCC) efter underskrivelse af en materialeoverførselsaftale (MTA) ([1]).

Indledning

15. På grund af forandringer i cellernes kapacitet til at producere E2 i takt med stigende alder/antal generationer (2) dyrkes cellerne efter en specifik protokol, før de bruges, og antal generationer efter optøning af cellerne og antal generationer på tidspunktet for nedfrysningen af cellerne og placering deraf i flydende nitrogen for opbevaring noteres. Det første tal viser det faktiske antal cellegenerationer og det andet beskriver antal generationer på det tidspunkt, hvor cellerne blev nedfrosset og efterfølgende opbevaret. Celler, der f.eks. blev nedfrosset efter femte generation, optøet og derefter spaltet tre gange (fire generationer, hvor frisk optøede celler tæller som generation 1), efter at de blev dyrket igen, betegnes generation 4,5. Et eksempel på en plan for nummerering findes i valideringsrapportens bilag I (4).

16. Der anvendes et stammedium som grundlag for berigede og frosne medier. Beriget medium er en nødvendig komponent i forbindelse med dyrkning af celler. Frysemedium er specifikt udviklet med henblik på langtidsnedfrysning af celler til opbevaring uden indvirkning på dem. Før brug analyseres Nu-serum (eller et tilsvarende serum med samme egenskaber, der påviseligt producerer data, som opfylder testkravene og kvalitetskontrolkravene), som er en bestanddel af beriget medium, for baggrundskoncentrationer af T og E2. Fremstillingen af disse opløsninger er beskrevet i bilag II til valideringsrapporten (4).

([1]) ATCC CRL-2128, ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Efter igangsættelse af en H295R-cellekultur på baggrund af en oprindelig ATCC-batch skal cellerne dyrkes i fem generationer, dvs. at cellerne deles fire gange). Derefter nedfryses femtegenerationsceller i flydende nitrogen med henblik på opbevaring. Før cellerne nedfryses, foretages der en kørsel af fjerdegenerationscellerne i en kvalitetskontrolplade (se pkt. 36-37) for at efterprøve, om grundproduktionen af hormoner og reaktionen på positive kontrolkemikalier opfylder kvalitetskontrolkriterierne for assayet som fastlagt i tabel 5.

18. H295R-celler skal dyrkes, nedfryses og opbevares i flydende nitrogen for at sikre, at der altid er celler af passende generation/alder til rådighed til dyrkning og anvendelse. Det maksimale antal generationer, efter der er at iværksat dyrkning af en ny ([1]) eller nedfrossen ([2]) batch af celler, der kan accepteres til brug for H295R-assayet, må ikke overstige 10. Der kan f.eks. accepteres 4,5-10,5 generationer for cellekulturer fra en batch, der er nedfrosset i generation 5. For celler, hvor dyrkningen iværksættes fra disse nedfrosne batches, følges proceduren i pkt. 19. Disse celler dyrkes i mindst fire (4) yderligere generationer (generation 4,5), før de anvendes til test.

Stamceller fra nedfrossen beholdning

19. Proceduren for at iværksætte dyrkning eller test af celler fra nedfrossen beholdning bruges, når en ny batch af celler hentes fra opbevaring i flydende nitrogen. Yderligere oplysninger om denne procedure findes i bilag III til valideringsrapporten (4). Celler fjernes fra opbevaring i flydende nitrogen, optøs hurtigt, anbringes i beriget medium i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, genopslæmmes i beriget medium og overføres til en dyrkningsflaske. Mediet udskiftes dagen efter. H295R-cellerne dyrkes i en inkubator ved 37 °C med 5 % CO_2 i atmosfærisk luft, og mediet fornyes 2-3 gange ugentligt. Når cellerne er omtrent 85-90 % sammenflydende, skal de spaltes. Cellespaltning er nødvendig for at sikre, at cellerne er sunde, at de vokser celler og for at have celler til rådighed til bioassays. Cellerne skylles tre gange i phosphatbufferet saltopløsning (PBS, uden Ca^{2+} Mg^{2+}) og udskilles fra dyrkningsflasken ved tilsætning af et passende adskillelsesenzym, f.eks. trypsin, i PBS (uden Ca^{2+} Mg^{2+}). Umiddelbart efter at cellerne adskilles fra dyrkningsflasken, indstilles enzymprocessen ved tilsætning af beriget medium i forholdet 3 × den mængde, der er anvendt til enzymbehandlingen. Celler anbringes i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, supernatanten fjernes, og cellemassen genopslæmmes i beriget medium. En passende mængde celleopløsning placeres i den nye dyrkningsflaske. Mængden af celleopløsning tilpasses, så cellerne er sammenflydende inden for 5-7 dage. Det anbefalede subdyrkningsforhold er 1:3 til 1:4. Pladen mærkes omhyggeligt. Cellerne er nu klar til brug i assayet, og overskydende celler nedfryses i flydende nitrogen som beskrevet i pkt. 20.

([1]) 'Ny batch' betyder en frisk batch af celler fra ATCC.

([2]) 'Nedfrossen batch' betyder celler, der er dyrket tidligere og senere nedfrosset på et andet laboratorium end ATCC.

▼M5

Nedfrysning af H295R-celler (fremstilling af celler til opbevaring i flydende nitrogen)

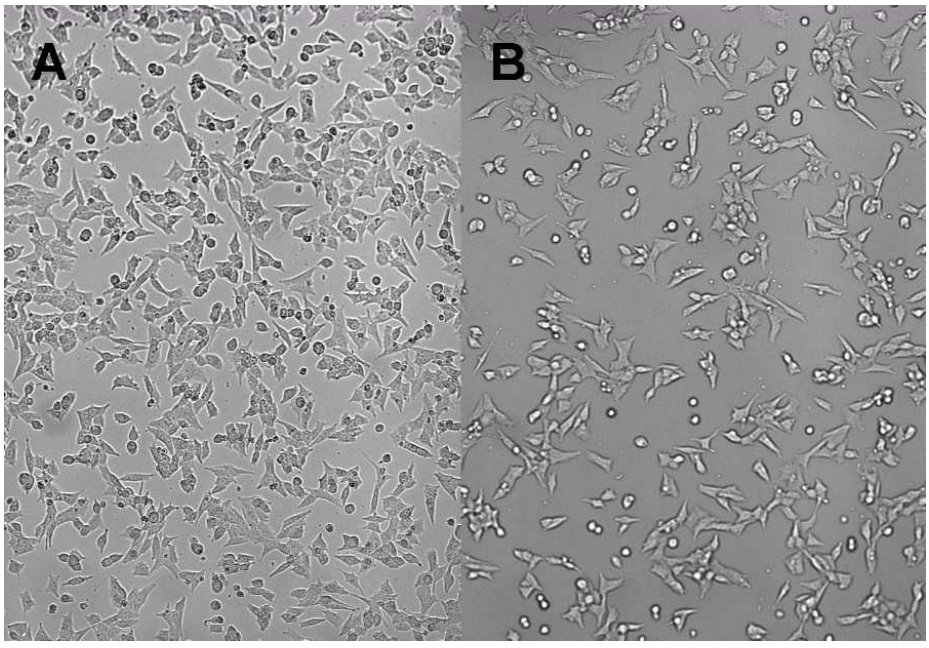
20. Til fremstilling af H295R-celler til nedfrysning følges den ovenfor beskrevne procedure for spaltning af celler indtil fasen med genopslæmming af cellemassen i bunden af centrifugeglasset. Her genopslæmmes cellemassen i frysemedium. Opløsningen overføres til et kryogent hætteglas, mærkes omhyggeligt og nedfryses ved – 80 °C i 24 timer, hvorefter det kryogene hætteglas overføres til opbevaring i flydende nitrogen. Yderligere oplysninger om denne procedure findes i bilag III til valideringsrapporten (4).

Udpladning og præinkubation af celler til test

21. Det nødvendige antal af 24-brøndsplader, fremstillet som beskrevet i pkt. 19, afhænger af antallet af kemikalier, der skal testes, og cellernes konfluens i dyrkningsskålene. Generelt er der i en dyrkningsflaske (75 cm^2) med 80-90 % sammenflydende celler nok til 1-1 1/2 plader (med 24 brønde) med en måltæthed på 200 000-300 000 celler pr. ml medium, hvilket resulterer i omtrent 50-60 % konfluens i brøndene efter 24 timer (figur 2). Dette er typisk den optimale celletæthed til hormonproduktion i assayet. Ved højere tætheder ændres produktionsmønstrene for både T og E2. Før assayet foretages for første gang, anbefales det at teste forskellige podningstætheder i størrelsesordenen 200 000-300 000 celler pr. ml, og den tæthed, der resulterer i en konfluens på 50-60 % i brønden efter 24 timer, vælges til yderligere eksperimenter.

Figur 2

Fotomikrograf af H295R-celler med en podningstæthed på 50 % i en dyrkningsplade med 24 brønde efter 24 timer taget ved kant (A) og i midten (B) af en brønd.



22. Mediet afpipetteres fra dyrkningsflasken, og cellerne skylles tre gange med sterilt PBS (uden $Ca^{2+}Mg^{2+}$). En enzymopløsning (i PBS) tilsættes for at adskille cellerne fra dyrkningsflasken. Efter at cellerne har haft passende tid til at adskilles, standses enzymprocessen ved tilsætning af beriget medium i forholdet 3 × den mængde, der er anvendt til enzymbehandlingen. Celler anbringes i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, supernatanten fjernes, og cellemassen genopslæmmes i beriget medium. Celletætheden beregnes ved hjælp af f.eks. et hæmocytometer eller celletæller. Celleopløsningen fortyndes til den ønskede udpladningstæthed og blandes

▼M5

omhyggeligt for at sikre en homogen celletæthed. Cellerne udplades med 1 ml af celleopløsningen/brønden, og plader og brønde mærkes. De podede plader inkuberes ved 37 °C under 5 % CO_2 i atmosfærisk luft i 24 timer, så cellerne kan binde sig til brøndene.

KVALITETSKONTROLKRAV

23. Det er vigtigt, at der anbringes nøjagtige mængder opløsning og prøver i brøndene under dosering, fordi disse mængder bestemmer de koncentrationer, der bruges i beregningerne af assayets resultater.

24. Før iværksættelse af celledyrkning og efterfølgende test skal hvert laboratorium påvise sit hormonmålesystems følsomhed (punkt 29-31).

25. Hvis der skal anvendes antistofbaserede hormonmålingsassays, analyseres de kemikalier, der skal testes, for deres potentiale til at forstyrre det målesystem, de anvendes til at kvantificere T og E2 som beskrevet i pkt. 32 forud for igangsættelsen af testen.

26. DMSO er det anbefalede opløsningsmiddel til assayet. Hvis der bruges et andet opløsningsmiddel, skal følgende fastslås:

— testkemikaliets, forskolins og procloraz' opløselighed i opløsningsmidlet

— cytotoksiciteten som en funktion af opløsningsmidlets koncentration.

Det anbefales, at den maksimalt tilladelige opløsningsmiddelkoncentration ikke overstiger en 10 × fortynding af den mindst cytotoksiske koncentration af opløsningsmidlet.

27. Før testen gennemføres for første gang, gennemfører laboratoriet et testforsøg for at godtgøre, at det er i stand til at opretholde og fremstille en passende cellekultur, og at de opfylder de forsøgsmæssige betingelser for kemisk test som beskrevet i pkt. 33-35.

28. Når der iværksættes test med en ny batch, køres en kontrolplade før brug af en ny batch af celler for at vurdere cellernes adfærd som beskrevet i pkt. 36-37.

Hormonmålesystemets ydeevne

Metodens sensitivitet, nøjagtighed, præcision og krydsreaktivitet i forhold til prøvematrix

29. Alle laboratorier kan frit vælge deres eget hormonmålesystem til analyse af produktionen af T og E2 med H295R-celler, blot det opfylder ydeevnekriterierne, herunder bestemmelsesgrænsen (LOQ). Nominelt er disse

▼M5

100 pg/ml for T og 10 pg/ml for E2, baseret på de basalhormonniveauer, der er observeret i valideringsundersøgelserne. Der kan dog anvendes højere eller lavere niveauer afhængigt af basalhormonniveauet, som det laboratorium, der foretager analysen, har opnået. Forud for initiering af kvalitetskontrolpladen og testkørsler påviser laboratoriet, at det hormonassay, der skal anvendes, kan måle hormonkoncentrationer i beriget medium med tilstrækkelig nøjagtighed og præcision til at opfylde kvalitetskontrolkriterierne i tabel 1 og 5, ved at analysere beriget medium spiked med en intern hormonkontrol. Beriget medium spikes med mindst tre koncentrationer af hvert hormon (f.eks. 100, 500 og 2 500 pg/ml T og 10, 50 og 250 pg/ml E2, eller de lavest mulige koncentrationer baseret på påvisningsgrænserne for det valgte hormonmålesystem kan bruges til de laveste spike-koncentrationer for T og E2) og analyseres. Målte hormonkoncentrationer af ikke-ekstraherede prøver skal ligge inden for 30 % af de nominelle koncentrationer, og variationer mellem replikatmålinger af samme prøve må ikke overstige 25 % (se også tabel 8 for yderligere kvalitetskontrolkriterier). Hvis disse kvalitetskontrolkriterier er opfyldt, antages det, at det valgte hormonmåleassay er tilstrækkelig nøjagtigt, præcist og ikke krydsreagerer med komponenter i mediet (prøvematrix), således at der kunne forventes en betydelig indflydelse på assayets resultat. I så fald kræves der ikke ekstraktion af prøver før målingen af hormoner.

30. Er kvalitetskontrolkriterierne i tabel 1 og 8 ikke opfyldt, kan der opstå en signifikant matrixeffekt, og der bør gennemføres et forsøg med ekstraheret spiked medium. Et eksempel på en ekstraktionsprocedure er beskrevet i bilag II til valideringsrapporten (4). Der bør foretages tredobbelte målinger af hormonkoncentrationerne i de ekstraherede prøver. ([1]) Hvis det kan påvises, at mediets komponenter efter ekstraktion ikke forstyrrer hormonpåvisningsmetoden som defineret i kvalitetskontrolkriterierne, bør alle yderligere forsøg foretages med ekstraherede prøver. Hvis kvalitetskontrolkriterierne ikke kan opfyldes efter ekstraktion, er det anvendte hormonmålesystem ikke egnet til anvendelse i H295R-steroidgenese-assayet, og der bør anvendes en anden metode til hormonpåvisning.

Standardkurve

31. Hormonkoncentrationerne i opløsningsmiddelkontrollerne (SC) bør ligge inden for den lineære del af standardkurven. SC-værdierne bør ligge tæt på midten af den lineære del for at sikre, at induktion og inhibering af hormonsyntese kan måles. De fortyndinger af medium (eller ekstrakter), der skal måles, udvælges i overensstemmelse hermed. Det lineære forhold bestemmes under anvendelse af en velegnet statistisk tilgang.

Test for kemisk interferens

32. Hvis der skal anvendes antistofbaserede assays såsom ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) og RIA (Radio-Immuno Assays) til at måle hormoner, testes hvert testkemikalie for potentiel interferens med det hormonmålesystem, der skal bruges, før iværksættelse af den faktiske test af kemikalierne (bilag III til valideringsrapporten(4)), fordi nogle kemikalier kan forstyrre disse test (17). Hvis der optræder en interferens på ≥ 20 % af basalhormonproduktion for T og/eller E2 som fastslået ved hormonanalyse, køres interferenstesten (Chemical Hormone Assay Interference Test) (som beskrevet i bilag III til valideringsrapporten (4) afsnit 5.0) for alle fortyndinger af testkemikaliets stamopløsning for at identificere den tærskeldosis, hvor der optræder betydelig interferens (≥ 20 %). Hvis interferensen er under 30 %, kan resultaternes korrigeres for denne. Hvis interferensen overstiger 30 %, er dataene ugyldige, og dataene ved disse koncentrationer bør kasseres. Hvis et testkemikalie interfererer med et hormonmålesystem ved

([1]) *NB:*Hvis ekstraktion er påkrævet, foretages der tre gentagne målinger for hvert ekstrakt. Hver prøve ekstraheres kun én gang.

▼M5

mere end en ikkecytotoksisk koncentration, bør der anvendes et andet hormonmålesystem. For at undgå interferens fra kontaminerende kemikalier anbefales det at ekstrahere hormoner fra mediet ved hjælp af et dertil egnet opløsningsmiddel. Mulige metoder kan findes i valideringsrapporten (4).

Tabel 1

Ydeevnekriterier for hormonmålesystemer

Parameter	Kriterium
Målemetodens sensitivitet	Bestemmelsesgrænse (LOQ) T: 100 pg/ml, E2: 10 pg/ml ([a])
Effektiviteten af hormonekstraktion (kun når ekstraktion er nødvendig)	De gennemsnitlige genvindingsprocenter (baseret på tredobbelte målinger) for spinkede mængder hormon må ikke afvige mere end 30 % fra den mængde, der blev tilsat.
Kemisk interferens (kun systemer baseret på antistof)	Der bør ikke indtræde nogen væsentlig (≥ 30 % af basalhormonproduktionen af det respektive hormon) krydsreaktivitet med de hormoner, der er fremstillet af cellerne ([b]), ([c])

([a]) *NB*: Metodemålegrænser er baseret på værdierne for basalhormonproduktion i tabel 5 og på ydeevne. Hvis der kan sikres en større basalhormonproduktion, kan grænsen være større.

([b]) Nogle T- og E2-antistoffer kan krydsreagere med androstendion og østron ved en større procentdel. I disse tilfælde er det ikke muligt at fastslå effekten på 17β-HSD nøjagtigt. Dataene kan dog stadig give nyttige oplysninger om effekten på østrogen- eller androgenproduktionen generelt. I disse tilfælde bør data udtrykkes som androgen-/østrogenreaktioner snarere end E2 og T.

([c]) Disse omfatter: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxycorticosteron, corticosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoxycortisol, cortisol, DHEA, androstenedion og østron.

Godkendelsestest af laboratoriet

33. Før ukendte kemikalier testes, skal et laboratorium påvise, at det er i stand til at fremstille og opretholde en egnet cellekultur, og at det opfylder testbetingelserne for at sikre en vellykket gennemførelse af assayet, ved at gennemføre en godkendelsestest af laboratoriet. Da kvaliteten af et assay hænger direkte sammen med det laboratoriepersonale, der gennemfører dette, bør disse procedurer delvist gentages, hvis der sker ændringer i personalesammensætningen.

34. Denne godkendelsestest gennemføres under de samme betingelser som beskrevet i pkt. 38-40, idet celler udsættes for syv stigende koncentrationer af stærke, moderate og svage inducere og inhibitorer samt et negativt kemikalie (se tabel 2). Specifikt omfatter de kemikalier, der skal testes, den stærke inducer forskolin (CAS-nr. 66575-29-9), den stærke inhibitor prochloraz (CAS-nr. 67747-09-5), den moderate inducer atrazin (CAS-nr. 1912-24-9), den moderate inhibitor aminoglutethimid (CAS-nr. 125-84-8), den svage inducer (E2-produktion) og den svage inhibitor (T-produktion) bisphenol A (CAS-nr. 80-05-7) samt den negative kemiskel humant chorion-gonadotropin (HCG) (CAS-nr. 9002-61-3) som vist i tabel 2. Sepa-

▼M5

rate
plader køres for alle kemikalier under anvendelse af det format, der er vist i tabel 6. En kvalitetskontrolplade (tabel 4, pkt. 36-37) indgår i hver daglig kørsel for kompetencekemikalierne.

Tabel 2

Kompetencekemikalier og eksponeringskoncentrationer

Kompetencekemikalie	Testkoncentrationer [μM]
Prochloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutethimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 3, 10, 30, 100
Bisphenol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) (DMSO) opløsningsmiddelkontrol (0), 1 μl DMSO/brønd

Udsættelse af H295R for kompetencekemikalier bør ske i plader med 24 brønde under laboratoriets godkendelsestest. Dosering er i μM for alle doser af testkemikalier. Doser bør indgives i DMSO ved 0,1 % v/v pr. brønd. Alle testkoncentrationer testes i tredobbelte brønde (tabel 6). Separate plader køres for hvert kemikalie. En kvalitetskontrolplade indgår i hver daglig kørsel.

35. Analyser af cellelevedygtighed og hormoner gennemføres som anført i pkt. 42-46. Tærskelværdien (laveste observerede effektkoncentration, LOEC) og klassificeringsafgørelser rapporteres og sammenlignes med værdierne i tabel 3. Dataene betragtes som acceptable, hvis de opfylder LOEC og klassificeringsafgørelsen i tabel 3.

Tabel 3

Tærskelværdier (LOEC) og klassificeringsafgørelse for kompetencekemikalier

	CAS-nr.	LOEC [μM]		Klassificeringsafgørelse	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inhibering)	+ (Inhibering)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Induktion)	+ (Induktion)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induktion)	+ (Induktion)
Aminoglutet-himid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibering)	+ (Inhibering)

▼M5

	CAS-nr.	LOEC [μM]		Klassificeringsafgørelse	
		T	E2	T	E2
Bisphenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibering)	+ (Induktion)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negativ	Negativ

([a]) +, positiv
n/a: ikke relevant, da der ikke bør indtræde ændringer efter udsættelse for ikkecytotoksiske koncentrationer ved negativ kontrol.

Kvalitetskontrolplade

36. Kvalitetskontrolpladen (QC-plade) bruges til at kontrollere H295R-cellernes ydeevne under standarddyrkningsforhold og til at oprette en historisk database for hormonkoncentrationer i opløsningsmiddelkontroller og negative kontroller samt andre kvalitetskontrolmålinger over tid.

— H295R-cellers ydeevne bør vurderes ved hjælp af en QC-plade for hver ny ATCC-batch eller efter anvendelse af nedfrosne celler for første gang, medmindre laboratoriets godkendelsestest (punkt 32-34) er kørt med samme cellebatch.

— En QC-plade giver en fuldstændig vurdering af assaybetingelserne (f.eks. cellernes levedygtighed, opløsningsmiddelkontroller, negative og positive kontroller samt levedygtighed intra- og inter-assay) ved test af kemikalier og bør indgå i hver testkørsel.

37. QC-testen foretages i en plade med 24 brønde og følger samme procedurer for inkubation, dosering, cellelevedygtighed/-cytotoksicitet, hormonekstraktion og hormonanalyse som beskrevet i pkt. 38-46 for test af kemikalier. QC-pladen indeholder tomme brønde, opløsningsmiddelkontroller og to koncentrationer af en kendt inducer (forskolin, 1, 10 μM) og inhibitor (prochloraz, 0,1, 1 μM) fra E2- og T-syntese. Desuden bruges MeOH i udvalgte brønde som en positiv kontrol til levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet. Der findes en detaljeret beskrivelse af pladen i tabel 4. De kriterier, der skal opfyldes på QC-pladen, findes i tabel 5. Den minimale basalhormonproduktion for T og E2 skal opnås i både opløsningsmiddelkontrol og tomme brønde.

Tabel 4

Kvalitetskontrolpladelayout for test af ydeevne for ikkeudsatte H295R-celler og celler, der udsættes for kendte inhibitorer (PRO = prochloraz) og stimulatorer (FOR = forskolin) ved produktion af E2 og T. Efter afslutningen af eksponeringsforsøget og fjernelse af mediet tilsættes en 70 % methanolopløsning til alle MeOH-brønde med henblik på en positiv kontrol for cytotoksicitet (se cytotoksicitetassay i bilag III til valideringsrapporten (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Tom ([a])	Tom ([a])	Tom ([a])	Tom ([a]) (+ MeOH) ([b])	Tom ([a]) (+ MeOH) ([b])	Tom ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

([a]) Celler i tomme brønde tilsættes kun medium (f.eks. ikke opløsningsmiddel).
([b]) Methanol (MeOH) tilsættes **efter** afslutningen af udsættelsen, og efter at mediet er fjernet fra disse brønde.
([c]) DMSO-opløsningsmiddelkontrol (1 µl/well).

Tabel 5

Ydeevnekriterier for kvalitetskontrolplade

	T	E2
Basalhormonproduktion i opløsningsmiddelsmiddelkontrollen (SC)	≥ 5 gange LOQ	≥ 2,5 gange LOQ
Induktion (10 µM forskolin)	≥ 1,5 gange SC	≥ 7,5 gange SC
Inhibition (1µM prochloraz)	≤ 0,5 gange SC	≤ 0,5 gange SC

PROCEDURE FOR EKSPONERING FOR TESTKEMIKALIE

38. De præinkuberede celler fjernes fra inkubatoren (punkt 21) og kontrolleres under et mikroskop for at sikre, at de er i god stand (binding og morfologi) før dosering.

39. Cellerne anbringes i et biosikkerhedskabinet, og det berigede medium fjernes og erstattes med nyt beriget medium (1 ml/brønd). DMSO er det foretrukne opløsningsmiddel til denne testmetode. Hvis der imidlertid er grund til at bruge andre opløsningsmidler, beskrives rationalet. Cellerne udsættes for testkemikaliet ved tilsætning af 1 µl af den passende stamopløsning i DMSO (se bilag II til valideringsrapporten (4)) pr. 1 ml beriget medium (brøndvolumen). Dette resulterer i en endelig koncentration på 0,1 % DMSO i brøndene. For at sikre tilstrækkelig blanding foretrækkes det generelt, at den passende stamopløsning af testkemikaliet i DMSO blandes med beriget medium for at sikre den ønskede endelige koncentration for hver dosis, og at blandingen tilsættes hver brønd umiddelbart efter fjernelse af det gamle medium. Hvis denne mulighed vælges, skal koncentrationen af DMSO (0,1 %) være den samme i alle brønde. Brønde med de to største koncentrationer bedømmes visuelt ved hjælp af et stereomikroskop med henblik på påvisning af evt. dannelse af bundfald eller uklarheder som en indikation for ufuldstændig opløselighed i testkemikaliet. Hvis noget sådant (uklarheder eller dannelse af bundfald) konstateres, undersøges brønde med lavere koncentrationer også (osv.), og koncentrationer, der ikke gik fuldstændigt i opløsning, udelukkes fra yderligere evaluering og analyse. Pladen anbringes igen i inkubatoren ved 37 °C under en 5 % CO_2 i atmosfærisk luft i 48 timer. Layoutet for testkemikaliepladen er vist i tabel 6. Stamopløsning 1-7 viser placering af stigende doser af testkemikaliet.

▼M5

Tabel 6

Doseringsprincip for udsættelse af H295R-celler for testkemikalier i en plade med 24 brønde.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stamopløsning 4	Stamopløsning 4	Stamopløsning 4
B	Stamopløsning 1	Stamopløsning 1	Stamopløsning 1	Stamopløsning 5	Stamopløsning 5	Stamopløsning 5
C	Stamopløsning 2	Stamopløsning 2	Stamopløsning 2	Stamopløsning 6	Stamopløsning 6	Stamopløsning 6
D	Stamopløsning 3	Stamopløsning 3	Stamopløsning 3	Stamopløsning 7	Stamopløsning 7	Stamopløsning 7

40. Efter 48 timer fjernes eksponeringspladerne fra inkubatoren, og hver brønd kontrolleres under mikroskop for cellernes tilstand (binding, morfologi, grad af konfluens) og tegn på cytotoksicitet. Mediet fra hver brønd deles i to lige store mængder (ca. 490 µl hver) og overføres til to særskilte hætteglas, som mærkes korrekt (dvs. en aliquot med henblik på at sikre en ekstra prøve for hver brønd). For at forhindre udtørring af cellerne fjernes mediet en række eller kolonne ad gangen og erstattes med mediet med henblik på levedygtigheds-/cytotoksicitetassayet af cellen. Hvis cellers levedygtighed/cytotoksicitet ikke måles med det samme, tilsættes 200 µl PBS med Ca^{2+} og Mg^{2+} til hver brønd. Medierne nedfryses til – 80 °C indtil videre behandling for at analysere hormonkoncentrationer (se pkt. 44-46). Mens T og E2 i medium opbevaret ved – 80 °C generelt er stabile i mindst tre måneder, skal hormonstabiliteten under opbevaring dokumenteres i hvert laboratorium.

41. Umiddelbart efter at have fjernet mediet bestemmes cellens levedygtighed/cytotoksicitet for hver eksponeringsplade.

Bestemmelse af cellelevedygtighed

42. Et assay vedrørende cellers levedygtighed/cytotoksicitet kan bruges til at bestemme testkemikaliets potentielle effekt på cellers levedygtighed. Assayet skal tilvejebringe en korrekt måling af procentdelen af levedygtige celler i en brønd, eller det skal påvise, at det er direkte sammenligneligt med (en lineær funktion af) Live/Dead® Assay (se bilag III i valideringsrapporten (4)). Et alternativt assay, der har vist sig at fungere lige så godt, er testen MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid](18). Bedømmelsen af cellelevedygtigheden under anvendelse af ovenstående metoder er en relativ måling, der ikke nødvendigvis står i et lineært forhold til det absolutte antal celler i en brønd. En analytiker bør derfor parallelt foretage en subjektiv visuel bedømmelse af hver brønd, og der bør tages digitale billeder af SC'er og de to største ikkecytotoksiske koncentrationer, som arkiveres med henblik på senere vurdering af reel celletæthed, hvis dette skulle blive nødvendigt. Hvis en visuel inspektion eller levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet viser, at der har været en stigning i antal celler, skal denne tilsyneladende stigning kontrolleres. Hvis der konstateres en stigning i celletallet ved kontrol, anføres dette i testrapporten. Cellelevedygtigheden udtrykkes i forhold til middelreaktionen i SC'erne, der betragtes som 100 % levedygtige celler, og beregnes for det anvendte cellelevedygtigheds-/cytotoksicitetsassay. For MTT-assayet kan følgende formel bruges:

▼M5

% levedygtige celler = (reaktion i brønd – middelreaktion i MeOH-behandlede [= 100 % døde] brønde) ÷ (middelreaktion i SC-brønde – middelreaktion i MeOH-behandlede [= 100 % døde] brønde)

43. Brønde med en levedygtighed på under 80 % i forhold til den gennemsnitlige levedygtighed i SC'erne (= 100 % levedygtighed) bør ikke indgå i den endelige dataanalyse. Inhibering af steroidgenese ved næsten 20 % cytotoksicitet bør evalueres omhyggeligt for at sikre, at cytotoksicitet ikke er årsagen til inhiberingen.

Hormonanalyse

44. Hvert laboratorium kan bruge et hormonmålesystem efter eget valg til analysen af T og E2. Overskydende aliquoter af medium fra hver behandlingsgruppe kan anvendes til fremstilling af fortyndinger med henblik på at sikre, at koncentrationen ligger inden for den lineære del af standardkurven. Som anført i pkt. 29 skal hvert laboratorium påvise, at deres hormonmålesystem (f.eks. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) overholder kvalitetskontrolkriterierne, ved at analysere beriget medium spiked med en intern hormonkontrol forud for gennemførelsen af kvalitetskontrolkørsler eller test af kemikalier. For at sikre, at testsystemets komponenter ikke forstyrrer målingen af hormoner, kan det være nødvendigt at ekstrahere disse fra mediet før måling (se pkt. 30 for betingelserne for, hvornår ekstraktion er nødvendig eller ikke). Det anbefales at foretage ekstraktion efter procedurerne i bilag III til valideringsrapporten (4).

45. Hvis der anvendes kommercielt testkit til måling af hormonproduktionen, bør hormonanalysen foretages som beskrevet i testkitproducentens manualer. De fleste producenter har en unik procedure for gennemførelse af hormonanalyser. Prøvefortyndinger skal tilpasses, således at de forventede hormonkoncentrationer for opløsningsmiddelkontrollerne kommer til at ligge i midten af den lineære del af standardkurven for det enkelte assay (bilag III i valideringsrapporten (4)). Værdier uden for den lineære del af standardkurven kasseres.

46. Endelige hormonkoncentrationer beregnes som følger:

Eksempel:

Ekstraheret:	450 µl medium
Rekonstitueret i:	250 µl assaybuffer
Fortynding i assay:	1:10 (så prøven kommer til at ligge inden for standardkurvens lineære del)
Hormonkoncentration i assay:	150 pg/ml (allerede tilpasset koncentration pr. ml analyseret prøve)
Genvinding:	89 %
Endelig hormonkoncentration =	(Hormonkoncentration (pr. ml) ÷ genvinding) (fortyndingsfaktor)
Endelig hormonkoncentration =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Udvælgelse af testkoncentration

47. Der bør gennemføres mindst to uafhængige kørsler af assayet. Medmindre forudgående information om f.eks. opløselighedsgrænser eller cytotoksicitet giver et grundlag for udvælgelse af testkoncentrationer, anbefales det at sprede testkoncentrationerne i den først kørsel efter log_{10}-intervaller, hvor 10^{-3} M er den maksimale koncentration. Hvis kemikaliet er opløseligt og ikkecytotoksisk ved de testede koncentrationer, og hvis den første kørsel var negativ for alle koncentrationer, skal det bekræftes i endnu en kørsel under samme betingelser som for den først kørsel (tabel 7). Hvis resultaterne af den første kørsel er tvetydige (dvs. at foldsændringen adskiller sig statistisk signifikant fra SC'en ved kun en koncentration) eller positive (dvs. at foldsændringen ved to eller flere koncentrationer er statistisk signifikant) bør testen gentages som angivet i tabel 7 ved at forfine de valgte testkoncentrationer. Testkoncentrationer ved kørsel to og tre (hvis relevant) tilpasses på basis af resultaterne af den første kørsel ved at isolere koncentrationer, der fremkalder en effekt, under anvendelse af et koncentrationsinterval på 1/2-log (hvis den oprindelige kørsel på 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 μM f.eks. resulterede i induktioner ved 1 og 10 μM, bør de koncentrationer, der testes i den anden kørsel, være 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), medmindre der skal anvendes lavere koncentrationer for at sikre en LOEC. I sidstnævnte tilfælde bør der i den anden kørsel anvendes mindst fem koncentrationer under den laveste koncentration, der blev testet i den første kørsel under anvendelse af en 1/2-logaritmisk skala. Hvis den anden kørsel ikke bekræfter den første (dvs. at den statistiske signifikans ikke optræder ved den tidligere positivt testede koncentration ± 1 koncentrationsforøgelse), skal der foretages et tredje forsøg under anvendelse af de oprindelige testbetingelser. Tvetydige resultater i første kørsel betragtes som negative, hvis den observerede effekt ikke kunne bekræftes i de to efterfølgende kørsler. Tvetydige resultater betragtes som positive reaktioner (virkning), når reaktionen kan bekræftes i mindst endnu en kørsel inden for en koncentrationsforhøjelse på a ± 1 (se afsnit 55 med hensyn til datafortolkningsproceduren).

Tabel 7

Afgørelsesmatrix for mulige resultatscenarier

Kørsel 1	Kørsel 2		Kørsel 3		Afgørelse	
Scenario	Afgørelse	Scenario	Afgørelse	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekræft ([a])	Negativ	Stop			X
Negativ	Bekræft ([a])	Positiv	Forfin ([b])	Negativ		X
Tvetydig ([c])	Forfin ([b])	Negativ	Bekræft ([a])	Negativ		X
Tvetydig ([c])	Forfin ([b])	Negativ	Bekræft ([a])	Positiv	X	
Tvetydig ([c])	Forfin ([b])	Positiv			X	
Positiv	Forfin ([b])	Negativ	Bekræft ([a])	Positiv	X	

▼M5

Kørsel 1	Kørsel 2		Kørsel 3		Afgørelse	
Scenario	Afgørelse	Scenario	Afgørelse	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekræft (a)	Positiv	Forfin (b)	Positiv	X	
Positiv	Forfin (b)	Positiv	Stop		X	

(a) Bekræft foregående kørsel under anvendelse af samme forsøgsdesign.
(b) Gennemfør assayet igen med et koncentrationsinterval på 1/2-log (isolering af den koncentration, der var signifikant forskellig i det foregående forsøg).
(c) Foldsændring ved én koncentration er statistisk signifikant forskellig fra SC'en

Kvalitetskontrol af testpladen

48. Ud over at opfylde kriterierne for kvalitetskontrolpladen skal andre kvalitetskriterier vedrørende acceptabel variation mellem hormonmålesystemers replikatbrønde, kontraforsøg, linearitet og sensitivitet, variabilitet mellem kontrahormonmålinger af samme prøve samt genvindingsprocent af hormon-spikes efter ekstraktion af medium (hvis relevant: se pkt. 30 vedrørende krav til ekstraktion) opfyldes. Disse kvalitetskriterier findes i tabel 8. Data skal ligge inden for de acceptable intervaller som fastlagt for hver parameter, der skal tages i betragtning til yderligere evaluering. Hvis disse kriterier ikke opfyldes, anføres det i regnearket, at kvalitetskontrolkriterierne ikke blev opfyldt for den pågældende prøve, og prøven analyseres igen eller fjernes fra datasættet.

Tabel 8

Acceptable intervaller og/eller variation (%) for parametre for H295R-assayets testplade

(LOQ: Bestemmelsesgrænse for hormonmålesystemet. CV: Variationskoefficient. SC: Opløsningsmiddelkontrol. DPM: Disintegrationer pr. minut)

	Sammenligning mellem	T	E2
Basalhormonproduktion i SC'er	Fold større end LOQ	≥ 5-fold	≥ 2,5-fold
Eksponeringsforsøg — inden for CV for SC'er (replikatbrønde)	Absolutte koncentrationer	≤ 30 %	≤ 30 %
Eksponeringsforsøg — mellem plade-CV for SC'er (replikatforsøg)	Foldsændring	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonmålesystem — sensitivitet	Påviselig fold-reduktion i forhold til SC	≥ 5-fold	≥ 2,5-fold
Hormonmålesystem — replikatmåling af CV for SC'er (a)	Absolutte koncentrationer	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstraktion af medium — genvinding af intern 3H-standard (hvis relevant)	DPM	≥ 65 % nominelt	

(a) Henviser til replikatmålinger af samme prøve.

▼M5

DATAANALYSE OG RAPPORTERING

Dataanalyse

49. For at evaluere den relative stigning/nedgang i kemisk ændret hormonproduktion normaliseres resultaterne til den gennemsnitlige SC-værdi for hver testplade, og resultaterne udtrykkes som ændringer i forhold til SC'en i hver testplade. Alle data udtrykkes som gennemsnitlig ± 1 standardafvigelse (SD).

50. Kun hormondata fra brønde med en cytotoksicitet på under 20 % medtages i dataanalysen. Relative ændringer beregnes som følger:

Relativ ændring = (hormonkoncentration i hver brønd) ÷ (middel-hormonkoncentration i alle opløsningsmiddelkontrolbrønde).

51. Hvis der ved visuel inspektion af brønden eller som påvist i levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet, jf. beskrivelse i pkt. 42, viser sig at være en stigning i celletal, kontrolleres denne tilsyneladende stigning. Hvis en stigning i celletal kontrolleres, anføres dette i testrapporten.

52. Før de statistiske analyser vurderes antagelserne vedrørende normalitet og varianshomogenitet. Normalitet bør evalueres under anvendelse af standard-sandsynlighedsplots eller en anden hensigtsmæssig statistisk metode (f.eks. Shapiro-Wilk-test). Hvis dataene (foldsændringer) ikke er normalt fordelt, forsøges der foretaget en transformation af dataene for at tilnærme dem en normal fordeling. Hvis dataene er normalt fordelt eller nærmer sig en normal fordeling, analyseres forskellene mellem kemiske koncentrationsgrupper og SC'er ved hjælp af en parametertest (f.eks. Dunnetts test), hvor koncentration er den uafhængige og reaktion (foldsændring) den afhængige variabel. Hvis data ikke er normalt fordelt, bruges en hensigtsmæssig ikkeparametertest (f.eks. Kruskal Wallis eller Steels many-one rank test). Forskelle anses som signifikante ved $p \leq 0,05$. Statistiske evalueringer baseres på middelværdier for hver brønd, der repræsenterer uafhængige replikatdatapunkter. Det forventes, at det på grund af det store interval mellem doser i den første kørsel (log_{10}-skala) i mange tilfælde ikke vil være muligt at beskrive klare koncentration-reaktion-forhold, hvor de to største doser vil ligge i den lineære del af sigmoidkurven. I den første kørsel eller ethvert andet datasæt, hvor dette forhold opstår (f.eks. hvor det ikke er muligt at anslå en maksimal virkning), anvendes statistik med fast variabel, type I, som beskrevet ovenfor.

53. Hvis flere end to datapunkter ligger i den lineære del af kurven, og hvor det er muligt at beregne maksimal virkning — som forventet for nogle af andenkørslerne, der foretages ved hjælp af et semi-log-interval for eksponeringskoncentrationer — følges en probit-, logit- eller anden hensigtsmæssig regressionsmodel til at beregne virkningsfulde koncentrationer (f.eks. EC50 og EC20).

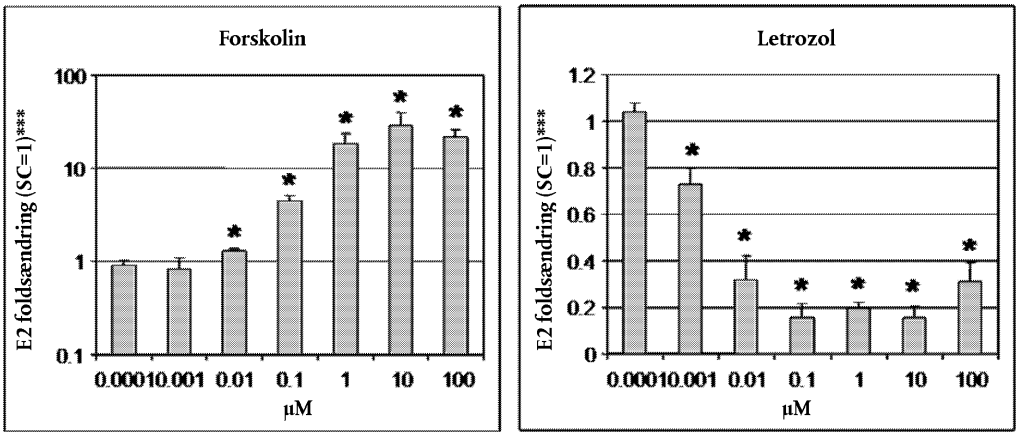
54. Resultater anføres både grafisk (blokdiagram, der repræsenterer gennemsnitlig ± 1 SD) og i tabelform (LOEC/NOEC, virkningsretning og styrke af maksimal reaktion, der indgår i dataenes del om dosisrespons) (se f.eks. figur 3). Vurdering af data anses kun for at være gyldig, hvis den er baseret på mindst to uafhængigt af hinanden gennemførte kørsler. Et forsøg eller en kørsel anses for at være uafhængig, hvis den er foretaget på en anden dato under anvendelse af et nyt sæt opløsninger og kontroller. Koncentrationsionsintervallet i kørsel 2 og 3 (hvis nødvendig) kan skræddersyes på grundlag af resultaterne af kørsel 1 for at sikre en bedre definition af det dosisresponsinterval, der indeholder LOEC (se pkt. 47).

▼M5

Figur 3

Eksempel på præsentation og evaluering af data fra H295R-assayet i grafisk form og tabelform.

Asterisker indikerer statistisk signifikante forskelle i forhold til opløsningsmiddelkontrollen ($p < 0,05$). LOEC: Lavest observerede effektive koncentration. maks. ændring: Maksimal styrke af den observerede reaktion ved enhver koncentration i forhold til SC-middel-reaktion (= 1)



Kemikalie	LOEC	Maks. ændring
Forskolin	0,01	0,15 fold
Letrozol	0,001	29 fold

Procedure for datafortolkning

55. Et testkemikalie anses for at være positivt, hvis fold-induktionen er statistisk forskellig ($p \leq 0,05$) fra opløsningsmiddelkontrollen ved to nærtliggende koncentrationer i mindst to uafhængige kørsler (tabel 7). Et testkemikalie anses for at være negativt efter to uafhængige negative kørsler eller tre kørsler omfattende to negative og en tvetydig eller positiv kørsel. Hvis data fra tre uafhængige forsøg ikke opfylder afgørelseskriterierne i tabel 7, kan forsøgsresultaterne ikke fortolkes. Resultater ved koncentrationer, der overstiger opløselighedgrænserne eller ved cytotoksiske koncentrationer bør ikke medtages i fortolkningen af resultater.

Testrapport

56. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testlaboratorium

— laboratoriets navn, placering

— forsøgsleder og andre medarbejdere og deres undersøgelsesansvar

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning.

▼**M5**

Testkemikalie, reagens og kontroller

— betegnelse (navn eller CAS-nr.), oprindelse, parti-/batchnummer, renhed, leverandør og beskrivelse af testkemikaliet, reagenser og kontroller

— testkemikaliets fysiske form og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— opbevaringsforhold samt metode og frekvens for tilberedning af testkemikalier, reagenser og kontroller

— testkemikaliets stabilitet.

Celler

— kilde til og type celler

— antal cellegenerationer (identifikation af cellegeneration) for celler anvendt i testen

— beskrivelse af procedurer for opretholdelse af cellekulturer.

Prætestkrav (hvis relevant)

— beskrivelse af resultater af test af kemisk interferens i hormonassay

— beskrivelse og resultater af målinger af effektivitet af hormonekstraktion

— standard- og kalibreringskurver for alle analytiske assays

— detektionsgrænser for udvalgte analytiske assays.

Testbetingelser

— mediers sammensætning

— testkemikaliets koncentration

— celletæthed (anslået eller målt cellekoncentration efter 24 og 48 timer)

— testkemikaliets opløselighed (grænse for opløselighed, hvis denne er fastlagt)

— inkubationtid og -betingelser.

Testresultater

— rådata for hver brønd for kontroller og testkemikalier — hver replikatmåling i form af de oprindelige data tilvejebragt af det instrument, der er brugt til at måle hormonproduktion (f.eks. OD, fluorescensenheder, DPM osv.)

— validering af normalitet eller forklaring på datatransformation

— middelreaktioner ± 1 SD for hver målt brønd

— data for cytotoksicitet (testkoncentrationer, der har forårsaget cytotoksicitet)

— bekræftelse på opfyldelse af kvalitetskontrolkriterier

▼M5

— relativ forandring sammenlignet med opløsningsmiddelkontrol korrigeret for cytotoksicitet

— et blokdiagram, der viser relativ (foldsændring) ved hver koncentration, SD og statistisk signifikans som anført i pkt. 49-54.

Fortolkning af data

— Anvend datafortolkningsproceduren på resultaterne, og drøft fund.

Diskussion

— Er der indikationer fra undersøgelsen vedrørende muligheden af, at T/E2-dataene kan være påvirket af indirekte indvirkning på gluco- og mineral-corticoid-veje?

Konklusioner

LITTERATUR

1) OECD (2002). OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, i bilag 2 til kapitel B.54 i dette bilag.

2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006). Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, Toxicol. Appl. Pharmacol., 217, 114-124.

3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007). The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. Env. Sci. Pollut. Res., 14, 23 — 30.

4) OECD (2010), Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MO-NO(2010)31, Paris. Tilgængelig på [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5) OECD (2010). Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

6) Battelle (2005). Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Tilgængelig på: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004). Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, Toxicol. Sci., 81, 78-89.

8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, Toxicol. Appl. Pharmacol., 182, 44-54.

9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010). Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, Environ. Health Perspect., 118: 265-272.

▼**M5**

(0) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010). Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, Environ. Sci. Poll. Res., 17:1137-1148.

11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, Cancer Res., 50, 5488-5496.

12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010). Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, Chemosphere, 80:578-584.

13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005). Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, Environ. Sci. Technol., 39:2777-2785.

14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010). Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, Environ. Sci. Pol. Res., 17:1137-1148.

15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993). Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77, 731-737.

16) Kapitel B.55 i dette bilag: Hershberger-bioassay med rotter: et korttidsscreeningassay for (anti)androgene egenskaber.

17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976). Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, J. Lab. Clin. Med., 2, 222-231.

18) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods., 65, 55-63.

19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006). Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼**M5**

Tillæg

DEFINITIONER

Konfluens betyder den tilladte celledækning af eller -spredning over kulturmediet.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

CV betegner variationskoefficienten som defineret som forholdet mellem en fordelings standardafvigelse og dens aritmetiske gennemsnit.

CYP står for cytochrom-P450-mono-oxygenaser, en familie af gener og enzymer produceret heraf, der indgår i katalysering af en lang række biokemiske reaktioner, herunder syntese og metabolisme af steroidhormoner.

DPM er disintegration pr. minut. Det er antal atomer i en bestemt mængde radioaktivt materiale, der påviseligt er henfaldet på ét minut.

E2 er 17β-østradiol, det vigtigste østrogen i pattedyrssystemer.

H295R-celler er humane adreno-carcinomceller, der har de fysiologiske karakteristika som zonalt udifferentierede adrenalceller hos menneskefostre, og som udtrykker alle enzymerne i den steroidgene vej. De kan erhverves fra ATCC.

Frysemedium bruges til at nedfryse og opbevare frosne celler. Det består af stammedium BD NuSerum og dimethylsulfoxid.

Lineært interval er det interval i standardkurven for et hormonmålesystem, hvor resultaterne er proportionale med koncentrationen i den analyt, der findes i prøven.

LOQ står for Limit of Quantification og er den mindste mængde af et kemikalie, der kan skelnes fra fraværet af samme kemikalie (en tom værdi) inden for et fastsat konfidensinterval. For denne metode defineres LOQ typisk af producenten af testsystemerne, medmindre andet er angivet.

LOEC står for 'Lowest Observed Effect Concentration', dvs. det laveste koncentrationsniveau, ved hvilket assayresponsen er statistisk forskellig fra opløsningsmiddelkontrollens.

NOEC står for 'No Observed Effect Concentration', hvilket er den højeste testede koncentration, hvis assayet ikke tilvejebringer en positiv respons.

Generation er det antal gange, celler deles efter initiering af en dyrkning fra nedfrosne celler. Den første generation, der blev iværksat fra den nedfrosne beholdning, betegnes som nr. et (1). Celler, der har delt sig én gang, betegnes generation 2 osv.

PBS er Dulbeccos phosphatbufferede saltopløsning.

Kvalitetskontrol, forkortelse QC, henviser til de målinger, der skal sikre gyldige data.

Kvalitetskontrolplade er en 24-brøndsplade indeholdende to koncentrationer af de positive og negative kontroller og anvendes til overvågning af resultaterne af en ny batch celler eller tilvejebringelse af positive kontroller til assayet i forbindelse med test af kemikalier.

Kørsel er et uafhængigt forsøg karakteriseret ved et nyt sæt opløsninger og kontroller.

▼**M5**

Stammedium er grundlaget for fremstillingen af andre reagenser. Det består af en 1:1-blanding af Dulbeccos Modified Eagle's Medium og Ham's F-12 Nutrient mixture (DMEM/F12) i 15 mM HEPES-buffer uden phenolrød eller natriumbicarbonat. Natriumbicarbonat tilsættes som buffer, se bilag II til valideringsrapporten (4).

Beriget medium består af stammedium plus BD Nu-Serum og ITS+ premium mix, se bilag II til valideringsrapport (4).

Steroidgenese er den syntesevej, der fører fra cholesterol til forskellige steroidhormoner. Flere mellemprodukter i steroidsyntesevejen såsom progesteron og testosteron er vigtige hormoner selv, men fungerer også som precursorer for hormoner længere ned ad syntesevejen.

T står for testosteron, en af de to vigtigste androgener i pattedyrssystemer.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Testplade er den plade, hvor H295R-celler eksponeres for testkemikalier. Testplader indeholder opløsningsmiddelkontrollen og testkemikalierne i syv koncentrationsniveauer in triplo.

Trypsin 1X er en fortyndet opløsning af enzymet trypsin, en bygspytkirtel-serinprotease, der anvendes til at løsne celler fra en celledyrkningsplade, se bilag III til valideringsrapporten (4).

▼M5

B.58. GENMUTATIONSTEST I SOMATISKE CELLER OG KØNSCELLER FRA TRANSGENE GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 488 (2013). EU's testmetoder er tilgængelige for en lang række in vitro-mutationsassays, der kan påvise kromosomale mutationer og/eller genmutationer. Der findes testmetoder for in vivo-slutpunkter (dvs. kromosomale afvigelser og ikkeplanlagt DNA-syntese). Disse måler dog ikke genmutationer. Assays af mutationer hos transgene gnavere (transgenic rodent, TGR) opfylder behovet for praktiske og lettilgængelige in vivo-test for genmutationer.

2. TGR-mutationsassays er beskrevet indgående (24) (33). Hertil anvendes transgene rotter og mus, der indeholder flere kopier af kromosomt integrerede plasmid- eller fagshuttlevektorer. Transgenerne indeholder reportergener til påvisning af forskellige typer mutationer induceret in vivo med testkemikalier.

3. Mutationer, der opstår hos en gnaver, bedømmes ved at genvinde transgenet og analysere reportergenets fænotype i en bakteriel vært, der er mangelfuld for reportergenet. TGR-genmutationsassays måler mutationer induceret i genetisk neutrale gener genvundet fra praktisk talt et hvilket som helst væv hos gnaveren. Disse assays omgår derfor mange af de eksisterende begrænsninger ved undersøgelsen af in vivo-genmutation i endogene gener (f.eks. begrænsede væv egnet til analyse, negativ/positiv udvælgelse i forhold til mutationer osv.).

4. 'Weight of evidence' tyder på, at transgener reagerer på mutagener på samme måde som på endogene gener, især med hensyn til påvisning af baseparsubstitution, læserammeforskydninger samt små deletioner og insertioner (24).

5. International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) har godkendt medtagelsen af TGR-genmutationassays til in vivo-påvisning af genmutationer og har anbefalet en protokol for deres gennemførelse (15)(29). Denne testmetode er baseret på disse anbefalinger. Yderligere analyse, som understøtter anvendelsen af denne protokol, findes i (16).

6. Det forventes, at det fremover kan være muligt at kombinere et TGR-genmutationsassay med en undersøgelse af toksicitet ved gentagen indgift (kapitel B.7 i dette bilag). Data skal dog sikre, at TGR-genmutationsassayets sensitivitet ikke påvirkes ved at afkorte tidsrummet mellem afslutningen på indgiftsperioden og prøvetagningsperioden med én dag, som det gøres i undersøgelsen af toksicitet ved gentagen indgift, sammenlignet med tre dage som brugt i TGR-genmutationsassayet. Der er også behov for data, som viser, at resultatet af assayet med gentagen indgift ikke påvirkes negativt ved at anvende en transgen stamme og ikke traditionelle gnaverstammer. Når disse data foreligger, vil testmetoden blive ajourført.

7. Definitioner af nøgletermer findes i bilaget.

▼**M5**

INDLEDENDE OVERVEJELSER

8. TGR-genmutationsassays, hvortil der er tilstrækkelige data til rådighed til at understøtte deres brug i denne testmetode, er: lacZ bakteriofag mus (Mutaä-mus), lacZ plasmid mus, gpt delta (gpt og Spi$^-$) mus og rotte, lacI mus og rotte (Big Blue®), som gennemført under standardbetingelser. Desuden kan det cII-positive-udvælgelsesassay bruges til at evaluere mutationer i Big Blue® og Mutaä-musemodeller. Mutagenese hos TGR-modellerne vurderes normalt som mutanthyppighed. Om nødvendigt kan en molekylær analyse af mutationerne dog tilvejebringe supplerende oplysninger (se pkt. 24).

9. Disse in vivo-genmutationstest hos gnavere er særligt relevante for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, idet reaktionerne i assayene afhænger af in vivo-metabolisme, farmakokinetik, DNA-reparationsprocesser og translesion-DNA-syntese, om end disse kan variere efter art, væv og type DNA-beskadigelse. Et in vivo-assay vedrørende genmutationer er ligeledes nyttigt til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist af et in vitro-system, og til opfølgning på resultater af test, hvor der er anvendt andre in vivo-endepunkter (24). Ud over kausalt at være associeret med induktion af kræft er genmutation et relevant endepunkt for forudsigelse af mutationsbaserede ikkekræftsygdomme i somatiske væv (12) (13) samt sygdomme overført gennem kimcellelinjen.

10. Hvis der er tegn på, at testkemikaliet eller en relevant metabolit ikke når frem til væv af interesse, er det ikke relevant at foretage et TGR-genmutationsassay.

PRINCIP FOR TESTEN

11. I de assays, der er beskrevet i pkt. 8, er målgenets oprindelse bakteriel eller bakteriofag, og det genvindes fra gnaverens genomiske DNA ved at inkorporere transgenet i en λ-bakteriofag eller plasmid shuttlevektor. Proceduren omfatter ekstraktion af genomisk DNA fra det interessante gnavervæv, in vitro-behandling af det genomiske DNA (dvs. pakning af λ-vektorer eller ligering og elektroporering af plasmider for at genvinde shuttlevektoren) og efterfølgende påvisning af mutationer i bakterielle værter under passende forhold. I disse assays anvendes neutrale transgener, der uden problemer kan genvindes fra de fleste væv.

12. Basisforsøget vedrørende TGR-genmutation omfatter behandling af gnaveren med et kemikalie i et vist tidsrum. Kemikalier kan indgives på den mest egnede måde, herunder implantation (f.eks. test af medicinsk anordning). Det samlede tidsrum, hvor et dyr er doseret, betegnes indgiftsperioden. Indgift følges normalt af en periode forud for aflivning, hvor kemikaliet ikke længere indgives, og hvor ikkereparerede DNA-læsioner fikseres til stabile mutationer. I litteraturen er denne periode blevet betegnet på forskellig måde — manifestationstid, fikseringstid eller ekspressionstid. Tidsrummets afslutning er tidspunktet for prøvetagning (15) (29). Når dyret er aflivet, isoleres genomisk DNA fra væv af interesse og oprenses.

▼M5

13. Data for et enkelt væv pr. dyr fra flere pakninger/ligeringer aggregeres almindeligvis, og mutanthyppigheden evalueres normalt ved hjælp af en total på mellem 10^5 og 10^7 plaquedannende eller kolonidannende enheder. Når der anvendes positive selektionsmetoder, bestemmes det samlede antal plaquedannende enheder med et særskilt sæt ikkeselektive plader.

14. Positive selektionsmetoder er udviklet for at lette påvisningen af mutationer i både gpt-genet [gpt-deltamus og -rotte, gpt^- fænotype (20) (22) (28)] og lacZ-gen [Muta™-mus eller lacZ-plasmid mus (3) (10) (11) (30)], mens lacI -genmutationer i Big Blue®-dyr påvises gennem en ikkeselektiv metode, der identificerer mutanter gennem dannelse af farvede (blå) plaques. Positiv selektionsmetodologi anvendes også til at påvise punktmutationer, der opstår i cII -genet i λ-bakteriofag shuttlevektoren [Big Blue®-mus eller -rotte og Muta™-mus (17)] og deletionsmutationer i λ red-og gam-gener [Spi^- selektion i gpt-deltamus og -rotte (21) (22) (28)]. Mutanthyppighed beregnes ved at dividere antallet af plaques/plasmider indeholdende mutationer i transgenet med det totale antal plaques/plasmider genvundet fra den samme DNA-prøve. I undersøgelser af TGR-genmutationer er mutanthyppigheden den rapporterede parameter. Desuden kan en mutationshyppighed bestemmes som fraktionen af celler, der bærer uafhængige mutationer. Denne beregning kræver korrektion for klonekspansion ved sekventering af de genvundne mutanter (24).

15. Mutationer, der er konstateret i lacI, lacZ, cII og gpt-punkt-mutationsassays, består primært af baseparsubstitutionsmutationer, læserammemutationer og små insertioner/deletioner. Disse mutationstypers relative andel af spontane mutationer svarer til, hvad der er konstateret for det endogene Hprt-gen. Store deletioner påvises kun med Spi^- selektionen og lacZ-plasmidassayene (24). Mutationer af interesse er in vivo-mutationer, der opstår hos musen eller rotten. In vivo- og ex vivo-mutationer, der kan opstå under fag-/plasmid-genvinding, -replikation eller -reparation, er relativt sjældne og kan i nogle systemer identificeres specifikt eller udelukkes af bakterieværten/det positive selektionssystem.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

16. Der findes en lang række forskellige modeller til detektering af genmutation hos mus, og disse systemer er blevet bredere anvendt end modeller for transgene rotter. Hvis rotter tydeligvis er mere hensigtsmæssige modeller end mus (f.eks. i forbindelse med undersøgelser af mekanismen for carcinogenese for en tumor, der kun er konstateret i rotter, at korrelere med en toksicitetsundersøgelse for rotter, eller, hvis det vides, at rotters metabolisme er mere repræsentativ for menneskers metabolisme), bør brug af modeller for transgene rotter overvejes.

Miljø og fodringsbetingelser

17. Temperaturen i dyreforsøgslokalet bør ideelt være 22 °C (± 3 °C). Skønt den relative fugtighed bør være mindst 30 % og helst ikke overstige 70 % bortset fra under rengøring, bør målet være at sikre en konstant relativ fugtighed på 50-60 %. Belysningen bør være kunstig med 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes et konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder

▼M5

kan påvirkes af behovet for at sikre en passende tilblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Dyr bør anbringes i små grupper (højst fem) af samme køn, hvis der ikke forventes aggressiv adfærd. Dyr kan opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

18. Sunde, unge, seksuelt modne voksne dyr (8-12 uger ved start af behandling) udvælges vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper. Dyrene identificeres unikt. Dyrene akklimatiseres til laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

19. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller vehikler eller iblandes foder eller drikkevand før indgift i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgift. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske fremstillinger af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/vehikel

20. Opløsningsmidlet/vehiklet må ikke frembringe toksiske virkninger ved de anvendte dosismængder og må ikke mistænkes for at indgå i kemisk reaktion med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre end velkendte opløsningsmidler/vehikler, skal deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/vehikler.

Positive kontroller

21. Samtidigt behandlede positive kontroldyr bør normalt anvendes. For laboratorier, der har godtgjort deres kompetence (se pkt. 23) og rutinemæssigt bruger disse assays, kan DNA fra tidligere behandlede positive kontroldyr indgå i hver undersøgelse for at bekræfte metodens succes. Sådant DNA fra tidligere forsøg bør hentes fra samme art og væv af interesse og opbevares korrekt (se pkt. 36). Når der anvendes samtidige positive kontroller, er det ikke nødvendigt at indgive dem ad samme vej som testkemikaliet, men det bør være kendt, at de positive kontroller fremkalder mutationer i et eller flere væv af interesse for testkemikaliet. Doserne af de positive kontrolkemikalier bør udvælges, således at de frembringer svage eller moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets udførelse og sensitivitet. Eksempler på positive kontrolkemikalier og nogle af deres målvæv findes i tabel 1.

▼M5

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolkemikalier og nogle af deres målvæv

Positivt kontrolkemikalie og CAS-nr.	EINECS-navn og EINECS-nr.	Specifikationer	Målvæv for mutationer	
			Rotte	Mus
N-ethyl-n-nitrosourinstof [CAS-nr. 759-73-9]	N-ethyl-n-nitrosourinstof [212-072-2]	Mutagen med direkte virkning	Lever, lunge	Knoglemarv, tyktarm, colon-epitel, tarm, lever, lunge, milt, nyre, ovarie-granulosaceller, hanlige kimceller
Ethylcarbamat (urethan) [CAS-nr. 51-79-6]	Urethan [200-123-1]	Mutagen, kræver metabolisme, men frembringer kun svage virkninger		Knoglemarv, formave, tyndtarm, lever, lunge, milt
2,4-diaminotoluen [CAS-nr. 95-80-7]	4-methyl-m-phenylendiamin [202-453-1]	Mutagen, kræver metabolisme, også positiv i Spi$^-$-assayet	Lever	Lever
Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]	Benzo[def]chrysen [200-028-5]	Mutagen, kræver metabolisme	Lever, væv,	Knoglemarv, bryst, tyktarm, formave, proventriculus, hjerte, lever, lunge, hanlige kimceller

Negative kontroller

22. Negative kontroller, kun behandlet med opløsningsmiddel eller vehikel og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, bør indgå for hver prøvetagningsperiode. Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/vehikel ikke fremkalder skadelige eller mutagene virkninger, bør ubehandlede kontroller også indgå for hver prøvetagningsperiode for at sikre godkendelse af vehikelkontrollen.

Kontrol af laboratoriets kompetence

23. Kompetence med hensyn til disse assays bør fastslås ved godtgørelse af kapaciteten til at reproducere forventede resultater ud fra offentliggjorte data (24) for: 1) mutanthyppigheder med positive kontrolkemikalier (inkl. svage reaktioner) såsom dem, der er anført i tabel 1, ikkemutagener og vehikelkontroller og 2) genvinding af transgener fra genomisk DNA (f.eks. pakningseffektivitet).

Sekventering af mutanter

24. Til regulatoriske anvendelser er DNA-sekventering af mutanter ikke nødvendig, især ikke hvor der er opnået et klart positivt eller negativt resultat. Datasekventering kan dog være nyttig, når der observeres stor variation mellem dyrene. I disse tilfælde kan sekventering anvendes til at udelukke muligheden af 'jackpots' eller klonhændelser ved at identificere andelen af unikke mutanter fra et bestemt væv. Sekventering af ca. 10 mutanter pr. væv pr. dyr burde være nok til blot at fastslå, om klonmutanter bidrager til mutanthyppigheden. Sekventering af op til 25 mutanter kan være nødvendig for at korrigere mutanthyppigheden matematisk for klonalitet. Sekventering af mutanter kan også overvejes, når der konstateres små stigninger i mutanthyppighed (som lige overstiger de ubehandlede kontrolværdier). Forskelle i mutantspektret mellem mutantkolonierne fra behandlede og ubehandlede dyr kan støtte en mutagen virkning (29). Mutationsspektre kan også anvendes til udvikling af mekanistiske hypoteser. Når

▼M5

sekventering skal indgå i undersøgelsesprotokollen, skal der udvises særlig omhyggelighed med udformningen af sådanne undersøgelser, især i henseende til antallet af mutanter, der sekventeres pr. prøve, for at opnå tilstrækkelig virkning ifølge den statistiske model, der er anvendt (se pkt. 43).

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

25. Antallet af dyr pr. gruppe bør fastlægges på forhånd, så der er nok til at opnå den nødvendige statistiske styrke til at påvise mindst én fordobling af mutanthyppigheden. Med hensyn til størrelse består en gruppe af mindst fem dyr. Hvis den statistiske styrke ikke er tilstrækkelig, øges antallet af dyr dog efter behov. Der bør normalt anvendes handyr. Der kan være tilfælde, hvor det er berettiget kun at teste hundyr. Det gælder f.eks., når der testes lægemidler beregnet for kvinder, eller når man undersøger kvindespecifik metabolisme. Hvis der er signifikante forskelle mellem kønnene i henseende til toksicitet eller metabolisme, skal der anvendes både hanner og hunner.

Indgiftsperiode

26. Baseret på observationer af, at mutationer akkumuleres med hver behandling, er et regimen med gentagen dosis nødvendig — med daglige behandlinger i en periode på 28 dage. Dette anses almindeligvis for acceptabelt til både generering af en tilstrækkelig akkumulering af mutationer af svage mutagener og til sikring af en eksponeringstid, der er tilstrækkelig til at påvise mutationer i langsomt opformerende organer. Alternative behandlingsprogrammer kan være egnede til visse evalueringer, og disse alternative doseringsplaner begrundes sagligt i protokollen. Behandlinger bør ikke være kortere end den tid, der skal anvendes til den fuldstændige induktion af alle de relevante metaboliserende enzymer, og kortere behandlinger kan kræve brug af flere prøvetagningsperioder, der passer til organer med forskellige formeringsgrader. Under alle omstændigheder skal al tilgængelig information (f.eks. om generel toksicitet eller metabolisme og farmakokinetik) bruges i begrundelsen for en protokol, især i forbindelse med afvigelser fra ovenstående standardanbefalinger. Behandlingstider på over otte uger kan øge sensitiviteten, men bør forklares tydeligt og begrundes, eftersom lange behandlingstider kan frembringe en tilsyneladende stigning i mutanthyppigheden gennem klonekspansion (29).

Dosisstørrelse

27. Dosisstørrelsen baseres på resultaterne af en dosis-range-finding-undersøgelse med måling af den generelle toksicitet, som gennemført med anvendelse af samme eksponeringsmåde, eller baseres på resultaterne af allerede eksisterende subakutte toksicitetsundersøgelser. Ikketransgene dyr af samme gnaverstamme kan anvendes til at bestemme dosisintervaller. For at tilvejebringe information om dosisreaktion (se pkt. 28) bør hovedundersøgelsen omfatte en fuldstændig undersøgelse, der omfatter en negativ kontrolgruppe (se pkt. 22) og mindst tre dosisniveauer med passende indbyrdes afstand, undtagen hvor grænsedosis er anvendt. Topdosis bør være den maksimalt tolererede dosis (MTD). MTD defineres som den dosis, der frembringer tegn på toksicitet, som indicerer, at højere dosisniveauer baseret på

▼M5

samme doseringsplan ville forventes at medføre letalitet. Kemikalier med specifikke biologiske aktiviteter ved lave ikketoksiske doser (såsom hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra doseringskriterierne og bør evalueres på ad hoc-basis. De anvendte dosisniveauer bør dække et interval fra maksimal til lav eller ingen toksicitet.

Grænsetest

28. Hvis dosis-range-finding-undersøgelser eller eksisterende data fra relaterede gnaverstammer indicerer, at en behandlingsplan med mindst grænsedosis (se nedenfor) ikke udløser observerbare toksiske virkninger, og hvis genotoksicitet ikke ville være forventelig på grundlag af data fra strukturelt beslægtede kemikalier, betragtes en fuldstændig undersøgelse under anvendelse af tre dosisniveauer ikke som nødvendig. For en indgiftsperiode på 28 dage (dvs. 28 daglige behandlinger) er grænsedosis 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgiftsperioder på 14 dage eller mindre er grænsedosis 2 000 mg/kg/kropsvægt/dag (doseringsplaner, der ikke omfatter 28 daglige behandlinger, bør begrundes sagligt i protokollen, se pkt. 26).

Indgift af doser

29. Testkemikaliet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle. Generelt bør den forventede indgiftsmåde for mennesker overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgiftsmåder (såsom drikkevand, subkutant, intravenøst, topisk, inhalation, intratrachealt, i kost eller implantation) kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da det ikke er en fysiologisk relevant måde for human eksponering. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større rumfang begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

Prøveudtagningstid

Somatiske celler

30. Prøveudtagningstiden er en kritisk variabel, fordi den bestemmes af den periode, der medgår til mutationernes fiksering. Denne periode er vævsspecifik og ser ud til at afhænge af cellepopulationens omdannelsestid, hvor knoglemarv og tarm er hurtige respondenter og leveren meget langsommere. Et egnet kompromis for måling af mutanthyppighed i både hurtigt og langsomt formerende væv er 28 fortløbende daglige behandlinger (som anført i pkt. 26) og prøveudtagning tre dage efter den sidste behandling, selv om den maksimale mutanthyppighed ikke nødvendigvis viser sig i langsomt formerende væv under disse forhold. Hvis langsomt formerende væv er af særlig betydning, kan en senere prøveudtagningstid på 28 dage efter indgiftsperioden på 29 dage være mere hensigtsmæssig (16) (29). I sådanne tilfælde erstatter den senere prøveudtagning den tre dage lange prøveudtagningstid og kræver saglig begrundelse.

▼M5

Kimceller

31. TGR-assays er velegnede til at undersøge induktion af genmutation i hanlige kimceller (7) (8) (27), hvor tidsintervaller og kinetik for spermatogenese er veldefineret (27). Det lave antal æg, der er tilgængelige for analyse, selv efter super-ovulation, og det forhold, at der ikke er en DNA-syntese i oocytten, udelukker bestemmelse af mutation i hunlige kimceller under anvendelse af transgene assays (31).

32. Prøveudtagningstiden for hanlige kimceller bør fastlægges på en sådan måde, at der udtages prøve af de udsatte celletyper igennem hele kimcelleudviklingen, og at det stadium, der er mål for udtagningen, er blevet tilstrækkeligt eksponeret. Udviklingen af kimceller fra spermatogonie-stamceller til moden sperma, der når vas deferens/cauda epididymis, er ~49 dage for mus (36) og ~70 dage for rotter (34) (35). Efter eksponering i 28 dage med en efterfølgende prøveudtagningsperiode på tre dage udgør akkumuleret sperma fra vas deferens/cauda epididymis (7)(8) en cellepopulation, der har været eksponeret i omtrent sidste halvdel af spermatogenesen, som omfatter den meiotiske og postmeiotiske periode, men ikke spermatogonie- eller kimcelleperioden. For at sikre tilstrækkelig udtagning af celler i vas deferens/cauda epididymis, der var spermatogonie-kimceller i eksponeringsperioden, er der behov for en yderligere prøveudtagningsperiode på mindst syv uger (mus) eller 10 uger (rotter) efter behandlingens afslutning.

33. Celler, der er ekstruderet fra sædkanaler efter behandling i 28 + 3 dage, omfatter en blandet population, der er beriget for alle stadier i kimcellernes udvikling (7) (8). Prøveudtagning af disse celler med henblik på påvisning af genmutation giver ikke en lige så nøjagtig vurdering af de stadier, hvor der induceres kimcellemutationer, som ved prøveudtagning af spermatozooer fra vas deferens/cauda epididymis (eftersom et interval af kimcelletyper er udtaget fra kanalerne, og nogle af de somatiske celler vil kontaminere denne cellepopulation). Prøveudtagning af celler fra sædkanaler ud over spermatozooer fra vas deferens/cauda epididymis efter en prøveudtagningsperiode på kun 28 + 3 dage vil dog give en vis dækning af eksponerede celler på tværs af de fleste faser i kimcelleudviklingen og kan være nyttig med hensyn til påvisning af visse kimcellemutagener.

Bemærkninger

34. Der bør foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Dyrenes helbredstilstand registreres. Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og mortalitet. Alle dyr vejes mindst én gang om ugen og ved aflivning. Foderindtag måles mindst én gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst én gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (23).

▼M5

Opsamling af væv

35. Rationalet for at indsamle væv beskrives klart. Eftersom det er muligt at undersøge mutationsinduktion i næsten alle væv, bør udvælgelse af det væv, der skal indsamles, være baseret på begrundelsen for, at man foretager undersøgelsen, og evt. eksisterende data om mutagenicitet, carcinogenicitet eller toksicitet for det undersøgte kemikalie. Vigtige faktorer, der bør indgå i overvejelserne, er indgiftsmåde (baseret på sandsynlige humane eksponeringsveje), den forventede vævsdistribution og den mulige handlingsmekanisme. Findes der ikke baggrundsinformation, bør der indsamles flere somatiske væv, som kan være af interesse. Der bør være eksempler på hurtigt og langsomt formerende væv og kontaktstedsvæv. Desuden bør der indsamles og lagres spermatozoer fra vas deferens/cauda epididymis og celler i udvikling fra sædkanalerne (som beskrevet i pkt. 32 og 33), hvis det senere skulle blive nødvendigt at analysere kimcellemutagenicitet. Organer vejes, og for større organer bør samme område indsamles for alle dyr.

Opbevaring af væv og DNA

36. Væv (eller vævshomogenater) skal opbevares ved eller under – 70 °C og bruges til isolation af DNA inden for fem år. Isoleret DNA, opbevaret nedkølet ved 4 °C i dertil egnede buffere, bør optimalt anvendes til mutationsanalyse inden for et år.

Udvælgelse af væv til mutantanalyse

37. Valg af væv baseres på følgende overvejelser: 1) indgiftsmåde eller første kontaktsted (f.eks. proventriculus, hvis indgift sker oralt, lunge, hvis indgift sker gennem inhalation, eller hud, hvis der er anvendt topisk påføring) og 2) farmakokinetiske parametre observeret i generelle toksicitetsundersøgelser, der indicerer konfiguration, retention og akkumulering af væv, eller målorganer for toksicitet. Hvis der foretages opfølgende undersøgelser til carcinogenicitetsundersøgelser, bør det overvejes at anvende målvæv for carcinogenicitet. Valget af væv til analyse skal maksimere påvisningen af kemikalier med direkte virkende in vitro-mutagener, som hurtigt metaboliseres, er yderst reaktive eller dårligt absorberede, eller kemikalier, for hvilke målvævet bestemmes af indgiftsmåden (6).

38. I mangel af baggrundsinformation og under hensyntagen til kontaktstedet, der bestemmes af indgiftsmåden, skal leveren og mindst ét hurtigt delende væv (f.eks. proventiculus eller knoglemarv) vurderes for mutagenicitet. I de fleste tilfælde kan ovenstående krav opfyldes med analyser af to omhyggeligt udvalgte væv, men i nogle tilfælde er der behov for tre eller flere. Hvis der er grund til at være specifikt bekymret over kimcellevirkninger, herunder positive reaktioner i somatiske celler, vurderes kimcellevæv for mutationer.

Målemetoder

39. Der findes sædvanlige laboratoriemetoder eller offentliggjorte metoder til påvisning af mutanter for de anbefalede transgene modeller: lacZ lambda bakteriofag og plasmid (30), lacI-mus (2) (18), gpt-deltamus (22), gpt-deltarotte (28), cII (17). Modifikationer begrundes og dokumenteres. Data fra flere pakninger kan aggregeres og bruges til at opnå et tilstrækkeligt antal plaques eller kolonier. Behovet for et stort antal pakningsreaktioner for at opnå det rigtige antal plaques kan være en indikation for dårlig DNA-kvalitet. I sådanne tilfælde skal data behandles med forsigtighed, da de

▼M5

kan være upålidelige. Det optimale samlede antal plaques eller kolonier pr. DNA-prøve bestemmes af den statistiske sandsynlighed for at påvise tilstrækkelig mange mutanter ved en given spontan mutanthyppighed. Generelt kræver det mindst 125 000-300 000 plaques, hvis den spontane mutanthyppighed er i størrelsesordenen 3×10^{-5} (15). For Big Blue® lacI-assayet er det vigtigt at påvise, at hele rækken af mutant-farvefænotyper kan påvises ved at inddrage et relevant antal farvekontroller i hver udpladning. Væv og deraf følgende prøver (emner) behandles og analyseres ved hjælp af et blokforsøg, hvor emner fra vehikel-/opløsningsmiddelkontrolgruppen, den positive kontrolgruppe (evt.) eller positivt kontrol-DNA (hvor det er relevant), og hver behandlingsgruppe behandles sammen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

40. Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. Forsøgsenheden er dyret. Rapporten skal omfatte det samlede antal plaquedannende enheder (pfu) eller kolonidannende enheder (cfu), antal mutanter samt mutanthyppighed for hvert væv fra hvert dyr. Hvis der er flere paknings-/redningsreaktioner, skal antallet af reaktioner pr. DNA rapporteres. Der skal indhentes data for hver enkelt reaktion, men kun det samlede antal pfu eller cfu skal anføres. Data om toksicitet og kliniske tegn skal anføres, jf. pkt. 34. Evt. sekventeringsresultater fremlægges for hver analyseret mutant, og deraf følgende beregninger af mutationshyppighed for hvert dyr og væv skal vises.

Statistisk evaluering og fortolkning af resultater

41. Der findes flere kriterier for fastlæggelse af et positivt resultat såsom en dosisrelateret stigning i mutanthyppigheden eller en klar stigning i mutanthyppigheden i en enkelt dosisgruppe sammenlignet med opløsningsmiddel-/vehikelkontrolgruppen. Mindst tre behandlede dosisgrupper skal analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til analyse af dosisreaktion. Mens resultaternes biologiske relevans skal være det primære hensyn, kan der benyttes statistiske metoder som en hjælp til at evaluere testresultaterne (4) (14) (15) (25) (26). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

42. Et testkemikalie, for hvilket resultaterne ikke opfylder ovenstående kriterier for et væv, betragtes som ikkemutagent i dette assay. Med hensyn til den biologiske relevans af et negativt resultat skal vævets eksponering bekræftes.

43. Med hensyn til DNA-sekventeringsanalyser findes der en række statistiske metoder, som kan anvendes til at fortolke resultaterne (1) (5) (9) (19).

44. Overvejelser om, hvorvidt de observerede værdier ligger inden eller uden for det historiske kontrolområde, kan være retningsgivende for evalueringen af reaktionens biologiske signifikans (32).

▼**M5**

Testrapport

45. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— identifikationsdata og CAS-nummer, hvis kendt

— kilde, source, referencenummer, hvis muligt

— fysiske egenskaber og renhedsgrad

— fysisk-kemiske egenskaber af relevans for undersøgelsens gennemførelse

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Opløsningsmiddel/vehikel

— begrundelse for valg af vehikel

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/vehiklet, hvis kendt

— fastlæggelse af sammensætning af diæt, drikkevand eller inhalationspræparat

— analytisk bestemmelse af sammensætninger (f.eks. stabilitet, homogenitet, nominel koncentration).

Testdyr

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— dyrenes antal, alder og køn

— kilde, miljøbetingelser, føde osv.

— dyrenes individuelle vægt ved forsøgets start, herunder interval for kropsvægt, middel- og standardafvigelse for hver gruppe.

Testbetingelser

— positive og negative (vehikel/opløsningsmiddel) kontroldata

— data fra range-finding-undersøgelse

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende fremstilling af testkemikaliet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— rationale for indgiftsmåde

— metoder for måling af animalsk toksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt hyppighed for observationer og kropsvejninger

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet nåede målvævet, eller generel cirkulation, hvis der er opnået negative resultater

▼**M5**

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant

— detaljer vedrørende foder og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg

— aflivningsmetode

— procedurer for isolering og bevaring af væv

— metoder for isolering af gnaveres genomiske DNA, elimination af transgener fra genomisk DNA og overførsel af transgent DNA til en bakterievært

— kilde og partinummer for alle celler, kits og reagenser (hvis relevant)

— metode til kvantitativ bestemmelse af mutanter

— metoder til molekylær analyse af mutanter og anvendelse til korrektion for klonalitet og/eller beregning af mutationshyppighed, hvis relevant.

Resultater

— dyrs tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— krops- og organvægt ved aflivning

— for hvert væv/dyr, antal mutanter, antal af evaluerede plaques eller kolonier, mutanthyppighed

— for hver vævs-/dyregruppe, antal pakningsreaktioner pr. DNA-prøve, totalt antal af mutanter, gennemsnitlig mutanthyppighed, standardafvigelse

— forhold mellem dosis-respons, hvor muligt

— for hvert væv/dyr, antal uafhængige mutanter og gennemsnitlig mutanthyppighed, hvis der er foretaget molekylær analyse

— sideløbende og historisk negative kontroldata med intervaller samt middel- og standardafvigelser

— samtidige positive kontroldata (eller ikkesamtidige positiv DNA-kontroldata)

— analytiske bestemmelser, hvis tilgængelige (f.eks. DNA-koncentrationer brugt i pakning, DNA-sekventeringsdata)

— statistiske analyser og anvendte metoder.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

▼**M5**

LITTERATUR

1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987). 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', J. Mol. Biol., 194: 391-396.

2) Bielas, J.H. (2002). 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', Mutation Res., 518: 107-112.

3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995). 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations' Nature, 377(6550): 657-659

4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995). 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', Environ. Mol. Mutagen, 25(3): 246-255.

5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996). 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', Environ. Mol. Mutagen, 28: 405-413.

6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999). 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens', Mutagenesis, 14(1): 141-151.

7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995). 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7485-7489.

8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997). 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', Mutation Res., 388(2-3): 197-212.

9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000). 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', Genetics, 156: 1411-1418.

10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989). 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971-7975.

11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993). 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host', Biotechniques, 14(3): 326, 330.

12) Erikson, R.P. (2003). 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', Mutation Res., 543: 125-136.

13) Erikson, R.P. (2010). 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', Mutation Res., **705: 96-106**.

14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998). 'Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', Mutagenesis, 13(3): 249-255.

15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', Environ. Mol. Mutagen., 35: 253-259.

16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003). 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', Environ. Mol. Mutagen., 41: 1-6.

▼**M5**

17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996). 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene TARGET', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(17): 9073-9078.

18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990). 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212-218.

19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008). 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996). 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465-470.

21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999). 'Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', Environ. Mol. Mutagen., 34(1): 9-15.

22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000). 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', Mutation Res., 455(1–2): 191-215.

23) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

24) OECD (2009). Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995). 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231-245.

26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997). 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249-289.

27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006). 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164-193.

28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010). 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003). 'In vivo Transgenic Mutation Assays', Mutation Res., 540: 141-151.

30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996). 'Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo' in: G. Pfeifer (ed.), Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005). 'A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', Mutation Res., 578(1-2): 117-123.

32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011). 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33) OECD (2011). Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^{o} 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972). 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198-236.

35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006). 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071-1148.

36) Russell, L.B. (2004). 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25-36.

▼M5

Tillæg

DEFINITIONER

Indgiftsperiode: samlet periode, i hvilken et dyr doseres.

Baseparsubstitution: en type mutation, der forårsager erstatning af en enkelt DNA-nukleotidbase med en anden DNA-nukleotidbase.

Capsid: den proteinskal, der omgiver en viruspartikel.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Klonal ekspansion: fremstilling af mange celler fra en enkelt (mutant) celle.

Kolonidannende enhed (cfu): måling af antal levedygtige bakterier.

Concatamer: et langt kontinuerligt biomolekyle bestående af flere identiske kopier forbundet i serier.

Cos-site: et enkeltstrenget DNA med 12 nukleotider, der findes i begge ender af den bakteriofage lambdas dobbeltstrengede genom.

Deletion: en mutation, hvor genomet mister en eller flere (sekventielle) nukleotider.

Elektropolering: påføring af elektriske impulser for at øge cellemembranernes gennemtrængelighed.

Endogent gen: et gen, der hører til genomet.

Extra-binomial variation: større variabilitet i gentagne skøn over en populationsandel, der ville være forventet, hvis populationen havde en binomial fordeling.

Læserammemutation: en genetisk mutation forårsaget af insertioner eller deletioner af et antal nukleotider, der ikke er deleligt med tre, i en DNA-sekvens, der koder for et protein/peptid.

Insertion: tilføjelse af et eller flere nukleotidbasepar i en DNA-sekvens.

Jackpot: et stort antal mutanter, der er opstået gennem klonekspansion fra en enkelt mutation.

Store deletioner: deletioner i DNA af en eller flere kilobaser (der er effektivt deleteret med Spi $^{-}$ selektionen og lacZ-plasmidassays).

Ligering: den kovalente forbinding af to ender af DNA-molekyler under anvendelse af DNA-base.

Mitogen: et kemikalie, der stimulerer en celle til at igangsætte celledeling og udløser mitose (dvs. celledeling).

Neutralt gen: et gen, der ikke påvirkes af positive eller negative selektive pres.

Pakning: syntese af infektiøse fag-partikler fra et præparat af fag-capsider og haleproteiner og en concatamer af DNA-fag-molekyler. Almindeligt brugt til at pakke DNA klonet på en lambdavektor (adskilt af cos-sites) i infektiøse lambdapartikler.

Pakningseffektivitet: den effektivitet, hvormed pakkede bakteriofager genvindes i værtsbakterier.

▼**M5**

Plaquedannende enhed (pfu): måling af antal levedygtige bakteriofag.

Punktmutation: en generel term for en mutation, der kun påvirker en lille sekvens DNA, herunder små insertioner, deletioner og basesubstitutioner.

Positiv udvælgelse: en metode, der tillader, at kun mutanter overlever.

Reportergen: et gen, hvis mutantgenprodukt er let at påvise.

Prøveudtagningstid: afslutningen på det tidsrum forud for aflivning, hvor kemikaliet ikke indgives, og hvor ubearbejdede DNA-skader fikseres i stabile mutationer.

Shuttlevektor: en vektor, der er er udformet, så den kan opformere to forskellige værtsarter. Følgelig kan DNA indsat i en shuttlevektor testes eller manipuleres i to forskellige celletyper eller to forskellige organismer.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Transgene: af, relateret til eller værende en organisme, hvis genom allerede er blevet ændret ved overførsel af et gen eller gener fra en anden art.

▼M7

B.59. **IN CHEMICO-HUDSENSIBILISERING: DIREKTE PEPTIDREAKTIVITETSASSAY (DPRA)**

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 442C (2015). Et hudsensibiliserende stof er et stof, der fremkalder en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ([1]). Denne forsøgsmetode indeholder en kemisk procedure (direkte peptidreaktivitetsassay — DPRA), der anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer i henhold til UN GHS og CLP.

Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, som ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i form af en Adverse Outcome Pathway (AOP) (2) fra den molekylære udløsende begivenhed gennem de mellemliggende begivenheder til den skadelige virkning, nemlig allergisk kontaktdermatitis hos mennesker eller kontaktoverfølsomhed hos gnavere. I hudsensibilisering-AOP'en er den molekylære udløsende begivenhed den kovalente binding af elektrofile stoffer til nuklofile centre i hudproteiner.

Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder baseret på marsvin, Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (3)), undersøger man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. En musetest, assay på lokale lymfeknuder (Local Lymph Node Assay (LLNA), TM B.42 (4)) og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (5)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), som alle udelukkende vurderer induktionsresponsen, er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvinetest, hvad angår dyrevelfærd og en objektiv måling af induktionsfasen for hudsensibilisering.

På det seneste har man anset mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder for videnskabeligt gyldige til evaluering af kemikaliers hudsensibiliseringsfare. Men der vil være behov for kombinationer af metoder uden brug af dyr (in silico, in chemico, in vitro) inden for integrerede tilgange til prøvning og vurdering (IATA) for fuldt ud at kunne erstatte de dyreforsøg, der anvendes i øjeblikket, i lyset af den begrænsede AOP-mekanistiske dækning af hver af de aktuelt tilgængelige forsøgsmetoder uden brug af dyr (2) (7).

Det foreslås, at DPRA bruges til at håndtere den molekylære udløsende begivenhed for hudsensibiliserings-AOP'en, nemlig proteinreaktivitet, ved at kvantificere testkemikaliernes reaktivitet over for modellens syntetiske peptider, som enten indeholder lysin eller cystein (8). De procentvise nedbrydningsværdier for cystein og lysin bruges herefter til at klassificere et stof i en af fire reaktivitetsklasser, der bruges som grundlag for sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer (9).

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M7

DPRA er blevet vurderet i en valideringsundersøgelse ledet af et EU-referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) og en efterfølgende uafhængig peer review udført af EURL ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) og betragtes som videnskabeligt underbygget (10) til brug som en del af en IATA til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Litteraturen indeholder eksempler på anvendelse af DPRA-data i kombination med andre oplysninger (11) (12) (13) (14).

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER, ANVENDELSE OG BEGRÆNSNINGER

Sammenhængen mellem proteinreaktivitet og hudsensibiliseringspotentiale er veldokumenteret (15) (16) (17). Men da proteinbinding kun udgør en vigtig begivenhed, selv om der er tale om den molekylære udløsende begivenhed for hudsensibiliserings-AOP'en, er oplysninger om proteinreaktivitet, der genereres med forsøgs- og ikke-forsøgsmetoder, muligvis ikke i sig selv tilstrækkelige til at konkludere, at kemikalier ikke kan forårsage hudsensibilisering. Derfor bør data genereret med denne forsøgsmetode ses i sammenhæng med integrerede tilgange, såsom IATA, idet de kombineres med andre supplerende oplysninger, f.eks. hidrørende fra in vitro-assays vedrørende andre vigtige begivenheder for hudsensibiliserings-AOP samt ikke-forsøgsmetoder, herunder analogislutninger fra analoge kemikalier.

Denne forsøgsmetode kan anvendes i kombination med andre supplerende oplysninger som begrundelse for forskelsbehandling mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer i forbindelse med IATA. Denne metode kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategorierne 1A og 1B som defineret i UN GHS/CLP, eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af den juridiske ramme kan et positivt udfald af DPRA imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS-/CLP-kategori 1.

DPRA-forsøgsmetoden har vist sig at kunne overføres til laboratorier, der har erfaring med højtrykvæskekromatografi (HPLC). Graden af reproducerbarhed for de forudsigelser, der kan forventes fra forsøgsmetoden, ligger i størrelsesordenen 85 % inden for laboratorier og 80 % mellem laboratorier (10). Resultater, der er fremkommet i valideringsundersøgelsen (18) og offentliggjorte undersøgelser (19), viser generelt, at nøjagtigheden af DPRA til sondring mellem sensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer er 80 % (N= 157) med en følsomhed på 80 % (88/109) og en specificitet på 77 % (37/48) sammenlignet med LLNA-resultater. Det er mere sandsynligt, at DPRA vil føre til for lave forudsigelser for kemiske stoffer med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1B) i forhold til kemikalier med høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (18) (19). De nøjagtige værdier, der her angives for DPRA som en selvstændig forsøgsmetode, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 ovenfor. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-test samt andre dyreforsøg ikke fuldt ud afspejler situationen hos arten af interesse, dvs. mennesker. På grundlag af de samlede tilgængelige data har DPRA vist sig at være relevant for testkemikalier, der dækker en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrke (som fastlagt ved *in vivo*-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (8) (9) (10) (19). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af DPRA som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfare.

▼M7

Betegnelsen »testkemikalie« anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af DPRA til test af stoffer og/eller blandinger. Denne forsøgsmetode er ikke anvendelig til test af metalforbindelser, da de er kendt for at reagere med proteiner gennem andre mekanismer end kovalent binding. Et testkemikalie bør være opløseligt i et passende opløsningsmiddel i en slutkoncentration på 100 mM (se punkt 18). Testkemikalier, der ikke er opløselige i denne koncentration, kan imidlertid stadig testes ved lavere opløselige koncentrationer. I så fald vil et positivt resultat stadig kunne anvendes til at understøtte bestemmelsen af testkemikaliet som hudsensibiliserende, men et negativt resultat bør ikke føre til nogen endelig konklusion om manglende reaktivitet. I øjeblikket er der begrænsede oplysninger tilgængelige om anvendeligheden af DPRA til blandinger med kendt sammensætning (18) (19). DPRA betragtes alligevel som teknisk anvendelig til test af stoffer med flere bestanddele og blandinger med kendt sammensætning (se punkt 18). Før brug af denne forsøgsmetode til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Den nuværende forudsigelsesmodel kan ikke anvendes til komplekse blandinger af ukendt sammensætning eller til stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. UVCB-stoffer) på grund af de definerede molforhold for testkemikalie og peptid. Der vil derfor skulle udvikles en ny forudsigelsesmodel til dette baseret på en gravimetrisk metode. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er anvendelig til andre specifikke kategorier af kemikalier, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til de pågældende kategorier.

Denne forsøgsmetode er en in chemico-metode, der ikke omfatter et metabolisk system. Kemikalier, der kræver enzymatisk bioaktivering for at udøve deres hudsensibiliseringspotentiale (dvs. pro-haptener), kan ikke spores med denne forsøgsmetode. Der findes rapporter om, at kemikalier, der bliver til sensibiliserende stoffer efter abiotisk omdannelse (dvs. præ-haptener), i nogle tilfælde kan spores korrekt med denne forsøgsmetode (18). I lyset af ovenstående bør negative resultater, der er opnået med forsøgsmetoden, fortolkes i lyset af de anførte begrænsninger og i kombination med andre informationskilder inden for rammerne af en IATA. Testkemikalier, der ikke bindes kovalent til peptidet, men fremmer dets oxidering (dvs. cysteindimerisering), kan medføre en overvurdering af peptidnedbrydningen, hvilket kan resultere i mulige falsk positive forudsigelser og/eller placering i en højere reaktivitetsklasse (jf. punkt 29 og 30).

Som beskrevet understøtter DPRA sondring mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer. Det kan imidlertid også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (11), når det bruges i integrerede tilgange såsom IATA. Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på data for mennesker, for at fastslå, hvordan DPRA-resultaterne kan anvendes til styrkevurderingen.

PRINCIP FOR TESTEN

DPRA er en *in chemico*-metode, der kvantificerer restkoncentrationen af cystein- eller lysin-holdigt peptid efter 24 timers inkubering med testkemikaliet ved 25 ± 2,5 °C. Den syntetiske peptid indeholder phenylalanin for at hjælpe med påvisningen. Den relative peptidkoncentration måles ved højtryksvæskekromatografi (HPLC) med gradienteluering og UV-detektion ved 220 nm. Herefter beregnes nedbrydningsværdierne for det cystein- og lysinholdige peptid i procent og anvendes i en forudsigelsesmodel (se punkt 29), som gør det muligt at placere testkemikaliet i en af fire reaktivitetsklasser, der anvendes som grundlag for sondringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

▼M7

Før rutinemæssig brug af den metode, der beskrives i denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.

FREMGANGSMÅDE

Denne forsøgsmetode er baseret på DPRA DB-ALM protokol nr. 154 (20), der repræsenterer den protokol, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen koordineret af EURL ECVAM. Det anbefales, at denne protokol anvendes, når metoden indføres og anvendes i laboratoriet. Følgende er en beskrivelse af de vigtigste DPRA-komponenter og procedurer. Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling, bør dens ækvivalens med den validerede opstilling, som beskrives i DB-ALM-protokollen, dokumenteres (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2).

Præparering af de cystein- eller lysinholdige peptider

Stamopløsninger af cystein (Ac-RFAACAA-COOH) og lysin (Ac-RFAAKAA-COOH), der indeholder syntetiske peptider med en renhed på over 85 % og helst i intervallet 90-95 %, fremstilles lige før deres inkubering med testkemikaliet. Slutkoncentrationen af cysteinpeptidet bør være 0,667 mM i pH 7,5-fosfatbuffer, mens slutkoncentrationen af lysinpeptid bør være 0,667 mM i pH 10,2-ammoniumacetatbuffer. HPLC-analysesekvensen bør fastlægges med henblik på at holde varigheden af HPLC-analysen under 30 timer. Til den HPLC-opstilling, som blev anvendt i valideringsundersøgelsen og beskrives i denne forsøgsmetode, kan op til 26 analyseprøver (der omfatter testkemikaliet, den positive kontrol og et hensigtsmæssigt antal opløsningsmiddelkontroller på grundlag af antallet af individuelle opløsningsmidler, der anvendes i testen, som hvert afprøves i tre eksemplarer), medtages i en enkelt HPLC-kørsel. Til alle replikater, som analyseres i samme kørsel, bør der anvendes identiske stamopløsninger af cystein- og lysinpeptid. Det anbefales at kontrollere, at de enkelte peptidbatches har korrekt opløselighed, inden de bruges.

Præparering af testkemikaliet

Teststoffets opløselighed i et passende opløsningsmiddel bør vurderes, inden assayet gennemføres, i henhold til opløselighedsproceduren, der beskrives i DPRA DB-ALM-protokollen (20). Et passende opløsningsmiddel vil opløse testkemikaliet helt. Eftersom en stor overskydende mængde af DPRA-testkemikaliet inkuberes i enten cystein- eller lysinpeptiderne, betragtes visuel kontrol af dannelsen af en klar opløsning for at være tilstrækkelig til at fastslå, at testkemikaliet (og alle dets komponenter i forbindelse med afprøvning af et stof med flere bestanddele eller en blanding) er opløst. Egnede opløsningsmidler er acetonitril, vand, en 1:1-blanding af vand og acetonitril, isopropanol, acetone eller en 1:1-blanding af acetone og acetonitril. Andre opløsningsmidler kan anvendes, så længe de ikke påvirker stabiliteten af peptidet, som overvåges med referencekontrol C (dvs. prøver bestående af peptid alene opløst i et passende opløsningsmiddel, jf. tillæg 3). Som en sidste mulighed, hvis testkemikaliet ikke er opløseligt i nogen af disse opløsningsmidler, må det forsøges at opløse det i 300 µl DMSO og fortynde den fremkomne opløsning med 2 700 µl acetonitril. Hvis testkemikaliet ikke er opløseligt i denne blanding, må det forsøges at opløse den samme mængde af testkemikaliet i 1 500 µl DMSO og fortynde den fremkomne opløsning med 1 500 µl acetonitril. Testkemikaliet bør afvejes på forhånd i hætteglas og opløses lige inden testen i et egnet opløsningsmiddel, så der fremstilles en 100 mM-opløsning. For blandinger og stoffer med flere bestanddele med

▼M7

kendt sammensætning bør en enkelt renhed bestemmes af summen af andelen af bestanddelene (undtagen vand), og en enkelt tilsyneladende molekylvægt bør bestemmes på grundlag af de enkelte molekylvægte af de enkelte bestanddele i blandingen (undtagen vand) og deres individuelle andele. Den resulterende renhed og tilsyneladende molekylvægt bør derefter bruges til at beregne den mængde testkemikalie, som skal bruges for fremstille en 100 mM-opløsning. For polymerer, for hvilke det ikke er muligt at fastslå en primær molekylvægt, kan molekylvægten af monomeren (eller den tilsyneladende molekylvægt af de forskellige monomerer, der udgør polymeren) anvendes til at fremstille en 100 mM-opløsning. Men ved test af blandinger, stoffer med flere bestanddele eller polymerer med kendt sammensætning bør det overvejes også at teste det rene kemikalie. For væsker bør det rene kemikalie testes uden forudgående fortynding ved at inkubere det med cystein- og lysinpeptiderne i et molforhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. For faste stoffer bør teststoffet opløses til sin maksimale opløselige koncentration i samme opløsningsmiddel, som bruges til at fremstille den tilsyneladende 100 mM-opløsning. For væsker bør det rene kemikalie testes uden forudgående fortynding ved at inkubere det med cystein- og lysinpeptiderne i et molforhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. Enslydende resultater (reaktive eller ikkereaktive) mellem den tilsyneladende 100 mM-opløsning og det rene kemikalie bør give mulighed for at udlede en entydig konklusion om resultatet.

Forberedelse af den positive kontrol, referencekontroller og co-elueringskontroller

Kanelaldehyd (CAS 104-55-2, ≥ 95 % fødevaregodkendt renhed) bør anvendes som positiv kontrol i en koncentration på 100 mM i acetonitril. Andre egnede positive kontroller, helst med nedbrydningsværdier i mellemområdet, kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for kørslen. Desuden bør man også medtage referencekontroller (dvs. prøver, der kun indeholder peptidet opløst i et passende opløsningsmiddel) i HPLC-analysesekvensen, og disse benyttes til at kontrollere HPLC-systemets egnethed forud for analysen (referencekontrol A), stabiliteten af referencekontrollerne over tid (referencekontrol B) og til at kontrollere, at det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet, ikke påvirker den procentvise peptidnedbrydning (referencekontrol C) (jf. tillæg 3). Den relevante referencekontrol for hvert kemikalie bruges til at beregne den procentvise peptidnedbrydning for det pågældende kemikalie (se punkt 26). Desuden bør man medtage en co-elueringskontrol, som udelukkende består af testkemikaliet, i analyseserien med henblik på at konstatere mulig co-eluering af testkemikaliet med enten lysin- eller cysteinpeptidet.

Inkubering af testkemikaliet med cystein- og lysinpeptidopløsningerne

Cystein- og lysinpeptidopløsninger bør inkuberes i autosampler-hætteglas med testkemikaliet i et forhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. Hvis der observeres bundfald umiddelbart efter tilsætning af testkemikalieopløsningen til peptidopløsningen på grund af testkemikaliets lave vandopløselighed, kan man ikke være sikker på, hvor meget af testkemikaliet, der forblev i opløsningen til at reagere med peptidet. Derfor kan man i sådanne tilfælde stadig bruge et positivt resultat, men et negativt resultat er usikkert og bør fortolkes med behørig forsigtighed (se også bestemmelserne i punkt 11 vedrørende test af kemikalier, der ikke er opløselige op til en koncentration på 100 mM). Reaktionsopløsningen bør stå i mørke ved 25 ± 2,5 °C i 24 ± 2 timer, før HPLC-analysen foretages. Hvert testkemikalie bør analyseres i tre eksemplarer for begge peptider. Prøverne skal undersøges visuelt forud for HPLC-analysen. Hvis der observeres bundfald eller faseadskillelse, kan prøverne centrifugeres ved lav hastighed (100-400 × g) for at tvinge bundfald til bunden af hætteglasset som en sikkerhedsforanstaltning, da store mængder bundfald kan tilstoppe HPLC-rør og -kolonner. Hvis der observeres bundfald eller faseadskillelse efter inkubationsperioden, kan peptidnedbrydningen være undervurderet, og man kan ikke udlede en konklusion om den manglende reaktivitet med tilstrækkelig sikkerhed i tilfælde af et negativt resultat.

▼M7

Udarbejdelse af standardkalibreringskurven for HPLC

Der bør genereres en kalibreringskurve for både cystein- og lysinpeptiderne. Peptidstandarder præpareres i en opløsning med 20 % eller 25 % acetonitrilbuffer i forhold til buffer, idet der anvendes fosfatbuffer (pH 7,5) til cysteinpeptidet og ammoniumacetatbuffer (pH 10,2) til lysinpeptidet. Under anvendelse af serielle fortyndingsstandarder for peptidstamopløsningen (0,667 mM) fremstilles der seks kalibreringsopløsninger, der dækker området fra 0,534 til 0,0167 mM. En blindprøve af fortyndingsbufferen bør også medtages i standardkalibreringskurven. Passende kalibreringskurver skal have en $r^2 > 0,99$.

Forberedelse af HPLC og analyse

HPLC-systemets egnethed skal kontrolleres forud for analysen. Peptidnedbrydningen overvåges af HPLC kombineret med en UV-detektor (fotodiodearraydetektor eller absorbansdetektor med fast bølgelængde med 220 nm-signal). Den relevante kolonne installeres i HPLC-systemet. Den HPLC-opstilling, der er beskrevet i den validerede protokol, består af en Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mμ som foretrukken kolonne. Med denne HPLC-kolonne med omvendt fase bør hele systemet bringes i ligevægt ved 30 °C med 50 % fase A (0,1 % (v/v) trifluoreddikesyre i vand) og 50 % fase B (0,085 % (v/v) trifluoreddikesyre i acetonitril) i mindst 2 timer før kørsel. HPLC-analysen bør udføres ved en flowhastighed på 0,35 ml/min. og en lineær gradient fra 10 % til 25 % acetonitril i 10 minutter efterfulgt af en hurtig stigning til 90 % acetonitril for at fjerne andre materialer. Der bør indsprøjtes lige store mængder af hver enkelt standard, prøve og kontrol. Kolonnen bør bringes i ligevægt igen under de oprindelige forhold i 7 minutter mellem injektionerne. Hvis der anvendes en anden HPLC-kolonne med omvendt fase, kan det være nødvendigt at justere de indstillingsparametre, der er beskrevet ovenfor, for at sikre en passende eluering og integration af cystein- og lysinpeptiderne, herunder injektionsvolumen, der kan variere alt efter det anvendte system (typisk i størrelsesordenen 3-10 μl). Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling, er det vigtigt at dokumentere dens ækvivalens med den validerede opsætning, som er beskrevet ovenfor (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2). Absorbans måles ved 220 nm. Hvis en fotodiodearraydetektor anvendes, registreres absorbansen ved 258 nm ligeledes. Det skal bemærkes, at nogle leverancer af acetonitril kan have en negativ indvirkning på peptidstabiliteten, og dette skal vurderes, når der anvendes et nyt batch acetonitril. Forholdet mellem toparealet ved 220 nm og toparealet ved 258 nm kan bruges som indikator for co-elueringen. For hver prøve vil et forhold i området 90 % < gennemsnitligt ([1]) områdeforhold for kontrolprøver < 100 % være en god indikation af, at co-elueringen ikke har fundet sted.

Der kan være testkemikalier, som kan fremme oxideringen af cysteinpeptidet. Topniveauet for det dimeriserede cysteinpeptid kan kontrolleres visuelt. Hvis dimeriseringen tilsyneladende er indtruffet, bør dette noteres, eftersom den procentvise peptidnedbrydning kan overvurderes, hvilket kan føre til falsk positive forudsigelser og/eller placering i en højere reaktivitetsklasse (jf. punkt 29 og 30).

HPLC-analyse af cystein- og lysinpeptider kan udføres samtidig (hvis der er to HPLC-systemer til rådighed) eller på forskellige dage. Hvis analysen udføres på forskellige dage, bør alle kemiske opløsninger fremstilles for begge assays på hver af disse dage. Tidspunktet for analysen vælges således, at injektionen af den første prøve indledes 22-26 timer efter, at testkemikaliet blev blandet med peptidopløsningen. HPLC-analysesekvensen bør fastlægges med henblik på at holde varigheden af HPLC-analysen under 30 timer. Til den HPLC-opstilling, der blev brugt i valideringsundersøgelsen, og som beskrives i denne forsøgsmetode, kan

([1]) Med gennemsnitlig menes det matematiske gennemsnit i hele dokumentet.

▼M7

der medtages op til 26 analyseprøver i en enkelt HPLC-kørsel (se også punkt 17). Tillæg 3 indeholder et eksempel på HPLC-analysesekvensen.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

Koncentrationen af cystein-eller lysinpeptidet bestemmes fotometrisk ved 220 nm i hver prøve ved at måle toparealet (areal under kurven, AUC) for de relevante toppe og ved at beregne peptidkoncentrationen ved hjælp af den lineære kalibreringskurve, som er afledt af disse standarder.

Den procentvise peptidnedbrydning bestemmes i hver prøve ved at måle toparealet og dividere det med det gennemsnitlige topareal for de relevante referencekontroller C (se tillæg 3) i henhold til nedenstående formel.

$$Peptidnedbrydning = \left[1 - \left(\frac{Peptidtopareal\ i\ replikat\ injektion}{Gnsn.peptidtopareal\ i\ referencekontroller\ C}\right)\right] \times 100$$

Acceptkriterier

Følgende kriterier bør være opfyldt, for at en kørsel kan anses for gyldig:

a) Standardkalibreringskurven bør have en $r^2 > 0{,}99$.

b) Den gennemsnitlige peptidnedbrydningsværdi i procent for de tre replikater for kanelaldehyden til den positive kontrol bør være mellem 60,8 % og 100 % for cysteinpeptidet og mellem 40,2 % og 69,0 % for lysinpeptidet, og den maksimale standardafvigelse for de positive kontrolreplikater bør være < 14,9 % for den procentvise cysteinnedbrydning og < 11,6 % for den procentvise lysinnedbrydning.

c) Den gennemsnitlige peptidkoncentration for referencekontrol A bør være 0,5 ± 0,05 mM og variationskoefficienten for peptidernes toparealer for de ni referencekontroller B og C i acetonitril bør være < 15,0 %.

Hvis et eller flere af disse kriterier ikke er opfyldt, bør kørslen gentages.

Følgende kriterier bør være opfyldt, hvis testresultatet for kemikaliet skal anses for gyldigt:

a) Den maksimale standardafvigelse for replikaterne af testkemikaliet bør være < 14,9 % for den procentvise cysteinnedbrydning og < 11,6 % for den procentvise lysinnedbrydning,

b) Den gennemsnitlige peptidkoncentration af de tre referencekontroller C i det relevante opløsningsmiddel bør være 0,50 ± 0,05 mM. Hvis disse kriterier ikke er opfyldt, bør dataene afvises og kørslen gentages for det pågældende testkemikalie.

Forudsigelsesmodel

Den gennemsnitlige procentvise cystein- og lysinnedbrydningsværdi i procent beregnes for hvert enkelt testkemikalie. Negativ nedbrydning betragtes som »0« ved beregning af middelværdien. Ved brug af cystein 1:10-/lysin 1:50-forudsigelsesmodellen i tabel 1 bør grænsen på 6,38 % for den gennemsnitlige peptidnedbrydning anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer inden for rammerne af en IATA. Det kan måske være nyttigt at anvende forudsigelsesmodellen til at placere et testkemikalie i en reaktivitetsklasse (dvs. lav, moderat og høj reaktivitet) som grundlag for styrkevurderingen inden for rammerne af en IATA.

▼M7

Tabel 1

Cystein 1:10/lysin 1:50-forudsigelsesmodel (1)

Middelværdi for procentvis cystein- og lysinnedbrydning	Reaktivitetsklasse	DPRA-forudsigelse (2)
0 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 6,38 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
6,38 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 22,62 %	Lav reaktivitet	Positiv
22,62 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 42,47 %	Moderat reaktivitet	
42,47 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 100 %	Høj reaktivitet	

(1) Tallene henviser til statistisk genererede tærskelværdier og er ikke forbundet med nøjagtigheden af målingen.
(2) Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 12.

Der kan være tilfælde, hvor testkemikaliet (stoffet eller en eller flere bestanddele af et stof eller en blanding) absorberer betydeligt ved 220 nm og har samme retentionstid for peptidet (co-eluering). Co-eluering kan afhjælpes ved at justere HPLC-opstillingen smule med henblik på at adskille elueringstiden for testkemikaliet og peptidet yderligere. Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling for at forsøge at afhjælpe co-elueringen, bør man dokumentere dens ækvivalens med den validerede opstilling (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2). Når co-eluering forekommer, kan topområdet for peptidet ikke kan integreres, og det er ikke muligt at beregne den procentvise nedbrydning af peptidet. Hvis co-eluering af sådanne testkemikalier forekommer i forbindelse med både cystein- og lysinpeptider, bør analysen rapporteres som »usikker«. I tilfælde, hvor co-eluering kun forekommer med lysinpeptidet, kan cystein 1:10-modellen, som er beskrevet i tabel 2, anvendes.

Tabel 2

Cystein 1:10-forudsigelsesmodel (1)

Procentvis cystein- (Cys) nedbrydning	Reaktivitetsklasse	DPRA-forudsigelse (2)
0 % ≤ procentvis Cys-nedbrydning ≤ 13,89 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
13,89 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 23,09 %	Lav reaktivitet	Positiv
23,09 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 98,24 %	Moderat reaktivitet	
98,24 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 100 %	Høj reaktivitet	

(1) Tallene henviser til statistisk genererede tærskelværdier og er ikke forbundet med nøjagtigheden af målingen.
(2) Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 12.

Der kan være andre tilfælde, hvor overlappet i retentionstid mellem testkemikaliet og de to peptider er ufuldstændig. I sådanne tilfælde kan man vurdere de procentvise peptidnedbrydningsværdier og anvende dem i cystein 1:10-/lysin 1:50-modellen, men det er imidlertid ikke muligt at foretage en præcis placering af testkemikaliet i en reaktivitetsklasse.

▼M7

En enkelt HPLC-analyse for både cystein- og lysinpeptidet bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når resultatet er entydigt. Men i tilfælde af resultater, der ligger tæt på den tærskelværdi, der bruges til at skelne mellem positive og negative resultater (dvs. usikre resultater), kan der være behov for yderligere undersøgelser. Hvis situationer, hvor den gennemsnitlige procentvise nedbrydning ligger i området 3 % til 10 % for cystein 1:10-/lysin 1:50-forudsigelsesmodellen, eller den procentvise cysteinnedbrydning ligger i området 9 %-17 % for cystein 1:10-forudsigelsesmodellen, bør man overveje endnu en kørsel og en tredje kørsel, hvis de to første kørsler giver modstridende resultater.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger

Testkemikalie

— Stof med kun en bestanddel

  — kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

  — fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

  — renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

  — eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

  — testede koncentrationer

  — opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

  — kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

  — fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

  — molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse

  — eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

  — testede koncentrationer

  — opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Kontroller

— positiv kontrol

  — kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

  — fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

  — renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

▼M7

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for kørsel, hvis det er relevant.

— Opløsningsmiddel/bærestof

— anvendt opløsningsmiddel/bærestof og forholdet mellem dets bestanddele, hvis det er relevant

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer

— renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i forsøgsmetoden, i det omfang, det er muligt

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier

— for acetonitril testresultater for indvirkningen på peptidstabilitet.

Præparering af peptider, positiv kontrol og testkemikalie

— karakterisering af peptidopløsninger (leverandør, parti, nøjagtig vægt af peptidet, tilsat mængde til stamopløsning)

— karakterisering af den positive kontroloplø sning (nøjagtig vægt af det positive kontrolstof, tilsat mængde til testopløsningen)

— karakterisering af opløsninger af testkemikaliet (nøjagtig vægt af testkemikaliet, tilsat mængde til testopløsningen).

Indstilling af HPLC-instrument og analyse

— type af HPLC-instrument, HPLC- og forkolonner, detektor, autosampler

— relevante parametre for HPLC-analysen såsom kolonnetemperatur, injektionsmængder, flow og gradient.

Systemets egnethed

— topareal for peptid ved 220 nm for hver standard- og referencekontrol A-replikat

— grafisk gengivelse af lineær kalibreringskurve og den indbettede r^2

— peptidkoncentrationen for hvert referencekontrol A-replikat

— gennemsnitlig peptidkoncentration (mM) i de tre referencekontroller A, SD og CV

— peptidkoncentrationen for referencekontrollerne A og C.

▼M7

Analysesekvens

— For referencekontroller:

  — topareal for peptid ved 220 nm for hvert B- og C-replikat

  — gennemsnitligt topareal for peptid ved 220 nm for de ni referencekontroller B og C i acetonitril, standardafvigelse og variationskoefficient (af hensyn til stabiliteten af referencekontrollerne i analyseperioden)

  — for hvert anvendt opløsningsmiddel toparealet for peptidet ved 220 nm for de tre relevante referencekontroller C (til beregning af den procentvise peptidnedbrydning)

  — for hvert anvendt opløsningsmiddel peptidkoncentrationen (mM) for de tre relevante referencekontroller C

  — for hvert anvendt opløsningsmiddel den gennemsnitlige peptidkoncentration (mM) for de tre relevante referencekontroller C, standardafvigelse og variationskoefficient.

— For positiv kontrol:

  — topareal for peptid ved 220 nm for hvert replikat

  — procentvis peptidnedbrydning for hvert replikat

  — gennemsnitlig peptidnedbrydning for de tre replikater, standardafvigelse og variationskoefficient.

— For hvert testkemikalie:

  — eventuel forekomst af bundfald i reaktionsblandingen ved afslutningen af inkubationstiden; om bundfaldet blev genopløst eller centrifugeret

  — forekomst af co-eluering

  — beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant

  — topareal for peptid ved 220 nm for hvert replikat

  — procentvis peptidnedbrydning for hvert replikat

  — gennemsnitlig peptidnedbrydning for de tre replikater, standardafvigelse og variationskoefficient

  — gennemsnitlige procentvise nedbrydningsværdier for cystein og lysin

  — anvendt forudsigelsesmodel og DPRA-forudsigelser.

Kompetencetest

— hvis det er relevant, den procedure, der anvendes til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Diskussion af resultaterne

— diskussion af de resultater, der er opnået med DPRA-forsøgsmetoden

— diskussion af forsøgsmetodens resultater i forbindelse med en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

▼M7

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment, No.168, OECD, Paris.

(3) Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.

(4) Kapitel B.42 i dette bilag: Assay på lokale lymfeknuder:

(5) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.

(6) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfekunder BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Tilgængelig på: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Tilgængelig på: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af interesse (2).

Kalibreringskurve: Forholdet mellem den eksperimentelle responsværdi og den analytiske koncentration (også kaldet standardkurve) for et kendt stof.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Variationskoefficient: Et mål for variation, der beregnes for en gruppe af replikationsdata ved at dividere standardafvigelsen med middelværdien. Den kan ganges med 100 for at opnå en procentsats.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

IATA (integreret tilgang til afprøvning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

Molekylær udløsende begivenhed: Kemikalieinduceret forstyrrelse af et biologisk system på molekylært niveau, der identificeres som startbegivenheden i AOP.

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (1).

Stof med kun en bestanddel: Et stof, der defineres af dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (vægt/vægt).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres af dets mængdemæssige sammensætning, hvori flere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (vægt/vægt) og < 80 % (vægt/vægt). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Referencekontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet

▼M7

opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (21).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (21).

Reproducerbarhed: Overensstemmelse mellem resultater af test af samme kemikalie med samme testprotokol (21).

Følsomhed: Andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (21).

Specificitet: Andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (21).

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (1).

Systemets egnethed: Bestemmelse af instrumentets funktionsdygtighed (f.eks. følsomhed) ved analyse af en referencestandard, før analyse-batchen køres (22).

Testkemikalie: Betegnelsen »testkemikalie« henviser til det, der bliver testet.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: En forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men kun i forbindelse med et bestemt formål (21).

▼M7

Tillæg 2

KOMPETENCESTOFFER

In chemico-hudsensibilisering: Direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA)

Før rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede DPRA-forudsigelse på korrekt vis for de 10 kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå cystein- og lysin-nedbrydningsværdier, der falder ind under de respektive referenceområder for 8 ud af de 10 kompetencestoffer for hvert peptid. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier er, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet og in vitro-data af høj kvalitet, der er genereret med DPRA, og at de blev anvendt i den EURL ECVAM-koordinerede valideringsundersøgelse til at påvise en vellykket gennemførelse af forsøgsmetoden i de laboratorier, der deltog i undersøgelsen.

Tabel 1

Anbefalede kompetencestoffer til dokumentation af teknisk kompetence i det direkte peptidreaktivitetsassay

Kompetencestoffer	CASRN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse [1]	DPRA-forudsigelse [2]	Interval [3] af procentvis cysteinpeptid-nedbrydning	Interval [3] af procentvis lysinpeptid nedbrydning
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast	Sensibiliserende stof (ekstrem)	Positiv	90-100	15-45
Oxazolon	15646-46-5	Fast	Sensibiliserende stof (ekstrem)	Positiv	60-80	10-55
Formaldehyd	50-00-0	Flydende	Sensibiliserende stof (stærk)	Positiv	30-60	0-24
Benzylidenacetone	122-57-6	Fast	Sensibiliserende stof (moderat)	Positiv	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Flydende	Sensibiliserende stof (svag)	Positiv	15-55	0-25
2,3-butanedion	431-03-8	Flydende	Sensibiliserende stof (svag)	Positiv	60-100	10-45
1-butanol	71-36-3	Flydende	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5
6-methylcoumarin	92-48-8	Fast	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5
Mælkesyre	50-21-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5
4-methoxyacetophenon	100-06-1	Fast	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5

[1] Forudsigelser for in vivo-fare og (styrke) er baseret på LLNA-data (19). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (23).

[2] Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11.

[3] Intervallerne fastlægges på grundlag af mindst 10 nedbrydningsværdier, som genereres af seks uafhængige laboratorier.

▼M7

Tillæg 3

EKSEMPLER PÅ ANALYSESEKVENSER

Kalibreringsstandarder og referencekontroller	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Fortyndingsbuffer Referencekontrol A, rep 1 Referencekontrol A, rep 2 Referencekontrol A, rep 3
Co-elueringskontroller	Co-elueringskontrol 1 for testkemikalie 1 Co-elueringskontrol 2 for testkemikalie 2
Referencekontroller	Referencekontrol B, rep 1 Referencekontrol B, rep 2 Referencekontrol B, rep 3
Første sæt replikater	Referencekontrol C, rep 1 Kanelaldehyd, rep 1 Prøve 1, rep 1 Prøve 2, rep 1
Andet sæt replikater	Referencekontrol C, rep 2 Kanelaldehyd, rep 2 Prøve 1, rep 2 Prøve 2, rep 2
Tredje sæt replikater	Referencekontrol C, rep 3 Kanelaldehyd, rep 3 Prøve 1, rep 3 Prøve 2, rep 3
Referencekontroller	Referencekontrol B, rep 4 Referencekontrol B, rep 5 Referencekontrol B, rep 6

Tre sæt referencekontroller (dvs. prøver, som udelukkende består af peptidet opløst i et passende opløsningsmiddel) bør indgå i analysesekvensen:
Referencekontrol A: anvendes til at kontrollere HPLC-systemets egnethed.
Referencekontrol B: indgår i begyndelsen og slutningen af analysesekvensen for at kontrollere stabiliteten af referencekontrollerne i løbet af analysen.
Referencekontrol C: indgår i analysesekvensen for at kontrollere, at det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet, ikke påvirker den procentvise peptidnedbrydning.

▼M7

B.60. **IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: ARE-NRF2-LUCIFERASE-FORSØGSMETODEN**

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 442D (2015). Et hudsensibiliserende stof er et stof, der fremkalder en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ([1]). Denne forsøgsmetode indeholder en in vitro-procedure (ARE-Nrf2-luciferase-assayet), der anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer i henhold til FN's GHS (1) og CLP.

Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, som ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i form af en Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), fra den molekylære udløsende begivenhed gennem de mellemliggende begivenheder til den skadelige sundhedsvirkning, dvs. allergisk kontaktdermatitis hos mennesker eller kontaktoverfølsomhed hos gnavere (2) (3). Den molekylære udløsende begivenhed er den kovalente binding af elektrofile stoffer til nukleofile centre i hudproteiner. Den anden centrale begivenhed i denne AOP finder sted i keratinocytter og omfatter inflammatoriske reaktioner samt genekspression forbundet med specifikke cellesignalveje, f.eks. antioxidant-/elektrofilresponselement- (ARE) afhængige veje. Den tredje centrale begivenhed er aktivering af dendritiske celler, som typisk vurderes ved ekspression af bestemte celleoverflademarkører, kemokiner og cytokiner. Den fjerde centrale begivenhed er T-celleproliferation, som vurderes indirekte ved assayet på lokale lymfeknuder i mus (4).

Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder baseret på marsvin, Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (5)) undersøger man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. En musetest, assayet på lokale lymfeknuder (LLNA, TM B.42 (4)), og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (6)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), som alle udelukkende vurderer induktionsresponsen, er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvinetest både, hvad angår dyrevelfærd og objektiv måling af induktionsfasen for hudsensibilisering.

På det seneste har man anset mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder for videnskabeligt valide til evaluering af kemikaliers hudsensibiliseringsfare. Men der vil være behov for kombinationer af metoder uden brug af dyr (in silico, in chemico, in vitro) inden for integrerede tilgange til afprøvning og vurdering (IATA) for fuldt ud at kunne erstatte de dyreforsøg, der anvendes i øjeblikket, i lyset af den begrænsede AOP-mekanistiske dækning af hver af de aktuelt tilgængelige forsøgsmetoder uden brug af dyr (2) (3).

Denne forsøgsmetode (ARE-Nrf2-luciferase-assay) foreslås i forbindelse med den anden centrale begivenhed som forklaret i punkt 2. Der foreligger rapporter om, at hudsensibiliserende stoffer har medført gener, der reguleres af antioxidantresponselementet (ARE) (8) (9). Små elektrofile stoffer såsom hudsensibiliserende stoffer kan påvirke sensorproteinet Keap1 (Kelch-lignende SSG-associeret protein

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M7

1), f.eks. ved kovalent modifikation af cysteinrestkoncentrationen, hvilket fører til dissociering fra transskriptionsfaktoren Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Den dissocierede Nrf2 kan herefter aktivere ARE-afhængige gener såsom dem, der koder for fase II-detoxificerende enzymer (8) (10) (11).

I øjeblikket er det eneste in vitro-Nrf2-luciferase-assay, der er omfattet af denne forsøgsmetode, KeratinoSens™-assayet, for hvilket man har gennemført valideringsundersøgelser (9) (12) (13) efterfulgt af en uafhængig peer review foretaget af Den Europæiske Unions referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) (14). KeratinoSens™-assayet blev betragtet som videnskabeligt validt til at kunne bruges som en del af en IATA til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og -mærkning (14). Laboratorier, som er villige til at anvende forsøgsmetoden, kan erhverve den rekombinante cellelinje, der anvendes i KeratinoSens™-assayet, ved at indgå en licensaftale med udvikleren af forsøgsmetoden (15).

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER, ANVENDELSE OG BEGRÆNSNINGER

Eftersom aktivering af Keap1-Nrf2-ARE-vejen udelukkende vedrører den anden centrale begivenhed i hudsensibiliserings-AOP'en, er det usandsynligt, at oplysninger om forsøgsmetoder baseret på aktiveringen af denne vej alene er tilstrækkelige til at kunne konkludere noget om kemikaliers hudsensibiliseringspotentiale. Derfor bør data genereret med denne forsøgsmetode ses i sammenhæng med integrerede tilgange, såsom IATA, idet de kombineres med andre supplerende oplysninger, f.eks. hidrørende fra in vitro-assays vedrørende andre vigtige begivenheder for hudsensibiliserings-AOP'en samt ikke-forsøgsmetoder, herunder analogislutning fra analoge kemikalier. I litteraturen findes der eksempler på, hvordan man kan bruge ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden sammen med andre oplysninger (13) (16) (17) (18) (19).

Denne forsøgsmetode kan bruges til at understøtte sondringen mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer i forbindelse med IATA. Denne forsøgsmetode kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategori 1A og 1B som defineret i UN GHS/CLP eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af lovrammen kan et positivt resultat imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS/CLP-kategori 1.

På baggrund af datasættet fra valideringsundersøgelsen og interne test i forbindelse med den uafhængige peer review af forsøgsmetoden viste KeratinoSens™-assayet sig at kunne overføres til laboratorier med erfaring i cellekulturer. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra forsøgsmetoden, ligger i størrelsesordenen 85 % inden for og mellem laboratorier (14). Nøjagtigheden (77 % — 155/201), følsomheden (78 % — 71/91) og specificiteten (76 % — 84/110) af KeratinoSens™-assayet til sondring mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer sammenlignet med LLNA-resultaterne blev beregnet ved at benytte alle de data, der blev rapporteret til EURL ECVAM med henblik på evaluering og peer review af forsøgsmetoden (14). Disse tal svarer til de nyligt offentliggjorte tal baseret på

▼M7

interne test af ca. 145 stoffer (77 % nøjagtighed, 79 % følsomhed, 72 % specificitet) (13). Det er mere sandsynligt, at KeratinoSens™-assayet vil føre til for lave forudsigelser for kemiske stoffer med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS/CLP-underkategori 1B) i forhold til kemikalier med høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS/CLP-underkategori 1A) (13) (14). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af KeratinoSens™-assayet som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfare. De nøjagtige værdier, der her angives for KeratinoSens™-assayet som en selvstændig forsøgsmetode, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør overvejes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 ovenfor. I forbindelse med vurderingen af metoder til hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA samt andre dyreforsøg ikke fuldt ud afspejler situationen hos arten af interesse, dvs. mennesker.

Betegnelsen »testkemikalie« anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden til test af stoffer og/eller blandinger. På grundlag af de nuværende tilgængelige data viste KeratinoSens™-assayet sig at være relevant for testkemikalier, der dækker en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrke (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (9) (12) (13) (14). Man testede hovedsagelig stoffer med en enkelt bestanddel, men der findes også en begrænset mængde data om test af blandinger (20). Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til stoffer med forskellige bestanddele og blandinger. Før brug af denne forsøgsmetode til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Ved test af stoffer med flere bestanddele eller blandinger bør der desuden tages hensyn til cytotoksiske bestanddeles eventuelle interferens med de observerede responser. Forsøgsmetoden gælder opløselige testkemikalier eller testkemikalier, der danner en stabil dispersion (dvs. en kolloid eller en suspension, hvor testkemikaliet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet i forskellige faser), enten i vand eller DMSO (herunder alle bestanddele af testkemikaliet ved test af et stof med forskellige bestanddele eller en blanding). Testkemikalier, der ikke opfylder disse betingelser ved den højeste krævede slutkoncentration på 2 000 μM (jf. punkt 22), kan stadig testes ved lavere koncentrationer. I så fald kan resultater, der opfylder kriterierne for positivitet som beskrevet i punkt 39, stadig anvendes til at hjælpe med bestemmelsen af testkemikaliet som hudsensibiliserende, mens et negativt resultat, der er opnået med koncentrationer < 1 000 μM, bør betragtes som usikkert (se forudsigelsesmodellen i afsnit 39). Generelt vil stoffer med en LogP på op til 5 være testet med succes, mens ekstremt hydrofobe stoffer med en LogP over 7 ligger uden for forsøgsmetodens kendte anvendelsesområde (14). For stoffer med en LogP på mellem 5 og 7 foreligger der kun begrænsede oplysninger.

Negative resultater bør fortolkes med forsigtighed, da stoffer med en eksklusiv reaktivitet over for lysinrester kan identificeres som negative med forsøgsmetoden. På grund af den anvendte cellelinjes begrænsede metaboliske kapacitet (21) og på grund af forsøgsbetingelserne kan pro-haptener (dvs. kemikalier, der kræver enzymatisk aktivering f.eks. via P450-enzymer) og haptener (dvs. kemikalier, der aktiveres ved selvoxidering), især med en langsom oxideringsgrad, også give negative resultater. Testkemikalier, der ikke virker sensibiliserende, men som ikke desto mindre er kemiske stressstoffer, kan på den anden side give falsk positive resultater (14). Desuden er det ikke altid muligt at foretage en pålidelig vurdering af stærkt cytotoksiske testkemikalier. Endelig kan testkemikalier, der reagerer med luciferaseenzymet, forstyrre luciferasens aktivitet i cellebaserede assays og forårsage enten synlig hæmning eller øget luminescens (22). Eksempelvis findes der rapporter om, at fytoøstrogenkoncentrationer på over 1 μM forstyrrede luminescenssignalerne i andre luciferasebaserede reportergenassays på grund af overaktivering af luciferasereportergenet (23). Som følge heraf skal den luciferaseekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller lignende kemiske stoffer, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende overaktivering af luciferasereportergenet, undersøges nøje

▼M7

(23). I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er anvendelig til andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til disse kategorier.

Ud over at bidrage til sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer leverer KeratinoSens™-assayet også oplysninger om koncentrationsrespons, der muligvis kan bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken ved anvendelse i integrerede metoder såsom IATA (19). Der er dog behov for yderligere arbejde, som fortrinsvis bør baseres på pålidelige data om mennesker, for at fastslå, hvordan resultaterne af KeratinoSens™-assayet kan bidrage til styrkevurderingen (24) og til placering af sensibiliserende stoffer i underkategorier i henhold til UN GHS/CLP.

PRINCIP FOR TESTEN

Til ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden anvendes en udødeliggjort vedhæftende cellelinje, der er afledt af humane HaCaT-keratinocytter, som er stabilt transfekteret med et valgbart plasmid. Cellelinjen indeholder luciferasegenet under transskriptionskontrollen for en konstitutiv promotor, der er sammensmeltet med et ARE-element, som vides at blive opreguleret af kontaktsensibiliserende stoffer (25) (26). Luciferasesignalet afspejler de sensibiliserende stoffers aktivering af endogene Nrf2-afhængige gener, og afhængigheden af luciferasesignalet i den rekombinante cellelinje på Nrf2 er blevet dokumenteret (27). Dette giver mulighed for kvantitativ måling (ved luminescensdetektion) af luciferasegeninduktion ved hjælp af veldokumenterede lysproducerende luciferasesubstrater som en indikator for Nrf2-transskriptionsfaktorens aktivitet i celler efter eksponering for elektrofile stoffer.

Testkemikalierne anses for positive i KeratinoSens™-assayet, hvis de forårsager en statistisk signifikant induktion af luciferaseaktiviteten over en bestemt tærskel (dvs. > 1,5 gange eller 50 % stigning) under en bestemt koncentration, som ikke i væsentlig grad påvirker cellernes levedygtighed (dvs. under 1 000 μM og i en koncentration, hvor cellernes levedygtighed er på over 70 % (9) (12)). Med henblik herpå bestemmes den maksimale foldinduktion af luciferaseaktiviteten over opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) (I_{max}). Da cellerne udsættes for serier af koncentrationer af testkemikalierne, skal den nødvendige koncentration for en statistisk signifikant induktion af luciferaseaktivitet over tærsklen (dvs. $EF_{1,5}$-værdi) interpoleres fra dosis/respons-kurven (se punkt 32 for beregninger). Endelig bør der foretages parallelle målinger af cytotoksicitet for at vurdere, om niveauerne for induktion af luciferaseaktivitet forekommer ved subcytotoksiske koncentrationer.

Før rutinemæssig brug af ARE-Nrf2-luciferase-assayet, der hører til denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.

Der stilles ydeevnestandarder (28) til rådighed for at lette valideringen af nye eller ændrede in vitro-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoder svarende til KeratinoSens™-assayet, og de gør det muligt at ændre denne forsøgsmetode i tide, så de kan medtages. Gensidig anerkendelse af data i henhold til OECD-aftalen vil kun være garanteret for forsøgsmetoder, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse forsøgsmetoder er gennemgået og medtaget i OECD's tilhørende testvejledning.

▼M7

FREMGANGSMÅDE

I øjeblikket er den eneste metode, der er omfattet af denne forsøgsmetode, det videnskabeligt validerede KeratinoSens™-assay (9) (12) (13) (14). Standardprocedurer for KeratinoSens™-assayet er tilgængelige og bør anvendes ved gennemførelse og brug af metoden i laboratoriet (15). Laboratorier, som er villige til at anvende forsøgsmetoden, kan erhverve den rekombinante cellelinje, der anvendes i KeratinoSens™-assayet, ved at indgå en licensaftale med udvikleren af forsøgsmetoden. Følgende afsnit indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden.

Fremstilling af keratinocytkulturerne

Der bør anvendes en transgen cellelinje med stabil indsættelse af luciferase-reportergenet, der kontrolleres af ARE-elementet (f.eks. KeratinoSens™-cellelinjen). Ved modtagelsen opformeres cellerne (f.eks. 2-4 generationer) og opbevares frosne som en homogen stamme. Celler fra den oprindelige stamme kan opformeres til det maksimale antal generationer (dvs. 25 for KeratinoSens™) og anvendes til rutinetest under anvendelse af det relevante opbevaringsmedium (for KeratinoSens™ er der tale om DMEM indeholdende serum og Geneticin).

Ved testen bør cellerne være 80-90 % sammenflydende, og det bør sikres, at cellerne aldrig er fuldkommen sammenflydende. En dag inden testen høstes cellerne og fordeles i plader med 96 brønde (10 000 celler/brønd for KeratinoSens™). Man bør være opmærksom på at undgå sedimentering af cellerne under udsåningen, så der sikres en ensartet fordeling af cellerne i brøndene. I modsat fald kan dette trin medføre stor variation fra brønd til brønd. For hver gentagelse anvendes tre replikater til måling af luciferaseaktivitet, mens et parallelt replikat bruges til cellelevedygtighedsassayet.

Præparering af testkemikalie og kontrolstoffer

Testkemikaliet og kontrolstofferne præpares på dagen for testen. For KeratinoSens™-assayet opløses testkemikalierne i dimethylsulfoxid (DMSO) til den ønskede slutkoncentration (f.eks. 200 mM). DMSO-opløsninger kan betragtes som selvsteriliserende, og der er således ikke behov for steril filtrering. Testkemikalier, der ikke er opløselige i DMSO, opløses i sterilt vand eller dyrkningsmedium, og opløsningerne steriliseres ved f.eks. filtrering. For et testkemikalie, som ikke har nogen defineret molekylvægt, fremstilles der en stamopløsning i en standardkoncentration (40 mg/ml eller 4 % (vægt/volumen)) i KeratinoSensTM-assayet. Hvis der benyttes andre opløsningsmidler end DMSO, vand eller dyrkningsmedium, bør der fremlægges en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse for dette.

Baseret på DMSO-stamopløsninger af testkemikaliet foretages der seriefortyndinger med DMSO for at opnå 12 master-koncentrationer af det kemikalie, der skal testes (fra 0,098 til 200 mM i KeratinoSens™-assayet). For et testkemikalie, der ikke er opløseligt i DMSO, foretages fortyndingerne for at opnå master-koncentrationerne med sterilt vand eller sterilt dyrkningsmedium. Uafhængigt af det anvendte opløsningsmiddel fortyndes skal master-koncentrationerne herefter fortyndes yderligere 25 gange i dyrkningsmedium indeholdende serum og endelig bruges til behandling med en yderligere fortyndingsfaktor på 4 gange, så slutkoncentrationen af testkemikaliet varierer fra 0,98 til 2 000 μM i KeratinoSens™-assayet. Alternative koncentrationer kan bruges, hvis det er begrundet (f.eks. i tilfælde af cytotoksicitet eller dårlig opløselighed).

Den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen), der anvendes i KeratinoSens™-assayet, er DMSO (CAS-nr. 67-68-5, ≥ 99 % renhed), hvortil der præpareres seks brønde pr. plade. Der foretages samme fortynding som beskrevet for master-koncentrationerne i punkt 22, således at slutkoncentrationen i den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen) er 1 %, der vides ikke at påvirke cellernes levedygtighed, og som svarer til samme DMSO-koncentration som i

▼M7

testkemikaliet og i den positive kontrol. For et testkemikalie, der ikke er opløseligt i DMSO, og hvor fortyndingerne er foretaget i vand, skal DMSO-niveauet for den endelige testopløsning i alle brønde justeres til 1 % som for de øvrige testkemikalier og kontrolstoffer.

Den positive kontrol, der bruges i KeratinoSens™assayet, er kanelaldehyd (CAS-nr. 14371-10-9, ≥ 98 % renhed), hvor der fremstilles en serie på fem master-koncentrationer fra 0,4 til 6,4 mM i DMSO (fra en 6,4 mM stamopløsning), der fortyndes som beskrevet for master-koncentrationer i punkt 22, således at slutkoncentrationen af den positive kontrol går fra 4 til 64 μM. Andre egnede positive kontroller, helst med $EC_{1,5}$-værdier i mellemområdet, anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for kørsel.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

For hvert testkemikalie og positive kontrolstof kræves der et forsøg for at udlede en forudsigelse (positiv eller negativ), der består af mindst to uafhængige gentagelser med hver tre replikater (dvs. n=6). I tilfælde af modstridende resultater for de to uafhængige gentagelser bør der udføres en tredje gentagelse med tre replikater (dvs. n=9). Hver selvstændig gentagelse udføres på en anden dag med en frisk stamopløsning af testkemikalier og uafhængigt høstede celler. Cellerne kan imidlertid komme fra den samme generation.

Efter podning som beskrevet i punkt 20 dyrkes cellerne i 24 timer i mikrotiterplader med 96 brønde. Herefter fjernes mediet og erstattes af frisk dyrkningsmedium (150 μl dyrkningsmedium med serum, men uden Geneticin for KeratinoSens™), hvortil der tilsættes 50 μl af det 25 gange fortyndede testkemikalie og kontrolstofferne. Mindst en brønd pr. plade bør være tom (ingen celler og ingen behandling) for at gøre det muligt at vurdere baggrundsværdierne.

De behandlede plader inkuberes derefter i ca. 48 timer ved 37 ± 1 °C under tilstedeværelse af 5 % CO_2 i KeratinoSens™-assayet. Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at dække pladerne med en folie inden inkubering med testkemikalierne.

Målinger af luciferaseaktivitet

Tre faktorer er afgørende for at sikre relevante luminescensaflæsninger:

— valg af et følsomt luminometer

— brug af et pladeformat med tilstrækkelig højde til at undgå krydskontaminering med lys og

— brug af et luciferasesubstrat med tilstrækkelig lysvirkning til at sikre tilstrækkelig følsomhed og lav variabilitet.

Inden testen udføres der et kontrolforsøg med opsætningen som beskrevet i tillæg 3 for at sikre, at disse tre punkter er opfyldt.

Efter 48 timers eksponering med testkemikaliet og kontrolstofferne i KeratinoSens™-assayet vaskes cellerne med fosfatbufferet saltopløsning, og den relevante lysisbuffer for luminescensaflæsninger tilsættes hver brønd i 20 min. ved stuetemperatur.

▼M7

Plader med cellelysat placeres derefter i luminometeret til aflæsning, som i KeratinoSens™-assayet er programmeret til at: i) tilsætte luciferasesubstrat til hver brønd (dvs. 50 µl), ii) vente 1 sekund og iii) integrere luciferaseaktiviteten i 2 sekunder. Hvis man anvender alternative indstillinger, f.eks. som følge af den anvendte luminometermodel, bør dette begrundes. Desuden kan man benytte et lyssubstrat, forudsat at kvalitetskontrolforsøget i tillæg 3 er lykkedes.

Vurdering af cytotoksicitet

For KeratinoSens™-assayet for cellelevedygtighed udskiftes mediet efter 48 timers eksponering med frisk medium med MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazolium-bromid, CAS-nr. 298-93-1), og cellerne inkuberes i 4 timer ved 37 °C under tilstedeværelse af 5 % CO_2. Herefter fjernes MTT-mediet, og cellerne lyseres (f.eks. ved tilsætning af 10 % SDS-opløsning til hver brønd) natten over. Efter omrystning måles absorptionen ved f.eks. 600 nm med et fotometer.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

Følgende parametre beregnes i KeratinoSens™-assayet:

— den maksimale gennemsnitlige foldinduktion af luciferaseaktivitet (I_{max}), der er observeret ved en hvilken som helst koncentration af testkemikaliet og den positive kontrol

— $EC_{1,5}$-værdien, der repræsenterer den koncentration, hvor en induktion af luciferaseaktiviteten på over tærsklen på 1,5 fold (dvs. 50 % større luciferaseaktivitet) blev opnået

— IC_{50}- og IC_{30}-koncentrationsværdierne for 50 % og 30 % reduktion af cellelevedygtigheden.

— Foldinduktionen af luciferaseaktiviteten beregnes ved hjælp af ligning 1, og den samlede maksimale foldinduktion (I_{max}) beregnes som et gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 1:

$$Fold\ induktion = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

hvor

L_{sample} er luminescensaflæsningen i brønden med testkemikaliet

L_{blank} er luminescensaflæsningen i brønden med blindprøven, der ikke indeholder celler og ikke er blevet behandlet

$L_{solvent}$ er den gennemsnitlige luminescensaflæsning i brønde, der indeholder celler og opløsningsmiddelkontrol (negativ kontrol)

$EC_{1,5}$ beregnes ved lineær interpolation i henhold til ligning 2, og den samlede $EC_{1,5}$ beregnes som det geometriske gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

hvor

C_a er den laveste koncentration i μM med > 1,5 fold induktion

C_b er den højeste koncentration i μM med < 1,5 fold induktion

I_a er foldinduktionen målt ved den laveste koncentration med > 1,5 fold induktion (gennemsnit af tre replikatbrønde)

I_b er foldinduktionen målt ved den højeste koncentration med < 1,5 fold induktion (gennemsnit af tre replikatbrønde)

Levedygtigheden beregnes med ligning 3:

Ligning 3:

$$Levedygtighed = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

hvor

V_{sample} er MTT-absorbansen i brønden med testkemikaliet

V_{blank} er MTT-absorbansaflæsningen i brønden med blindprøven, der ikke indeholder celler og ikke er blevet behandlet

$V_{solvent}$ er den gennemsnitlige MTT-absorbansaflæsning i brønde, der indeholder celler og opløsningsmiddelkontrol (negativ kontrol)

IC_{50} og IC_{30} beregnes ved lineær interpolation i henhold til ligning 4, og den samlede IC_{50} og IC_{30} beregnes som det geometriske gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

hvor

X er den procentvise reduktion i den koncentration, der skal beregnes (50 og 30 for IC_{50} og IC_{30})

C_a er den laveste koncentration i μM med > x % reduktion af levedygtigheden

C_b er den højeste koncentration i μM med < x % reduktion af levedygtigheden

V_a er den procentvise levedygtighed ved den laveste koncentration med > x % reduktion af levedygtigheden

V_b er den procentvise levedygtighed ved den højeste koncentration med < x % reduktion af levedygtigheden

For hver koncentration, der udviser > 1,5 foldinduktion af luciferaseaktivitet, beregnes den statistiske signifikans (f.eks. ved hjælp af den tohalede Student's t-test), hvor man sammenligner luminescensværdierne for de tre replikate prøver med luminescensværdierne i brøndene med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) for at afgøre, hvorvidt induktionen af luciferaseaktivitet er statistisk signifikant ($p < 0,05$). Den laveste koncentration med > 1,5 fold induktion af luciferaseaktivitet er den værdi, der bestemmer $EC_{1,5}$-værdien. Det undersøges i hvert enkelt tilfælde, om denne værdi er lavere end IC_{30}-værdien, hvilket indikerer, at der er mindre end 30 % reduktion i cellelevedygtigheden ved den $EC_{1,5}$-værdi, der fastlægger koncentrationen.

▼M7

Det anbefales, at data kontrolleres visuelt ved hjælp af grafer. Hvis der ikke kan konstateres nogen tydelig dosis/respons-kurve, eller dosis/respons-kurven er bifasisk (dvs. grænsen på 1,5 passeres to gange), bør forsøget gentages for at kontrollere, om dette er specifikt for testkemikaliet eller skyldes en eksperimentel artefakt. Hvis den bifasiske respons kan reproduceres ved et uafhængigt forsøg, bør den laveste $EC_{1,5}$-værdi (koncentrationen, hvor grænsen på 1,5 krydses første gang) rapporteres.

I de sjældne tilfælde, hvor en statistisk ikke-signifikant induktion over 1,5 fold observeres efterfulgt af en højere koncentration med en statistisk signifikant induktion, betragtes resultaterne af denne gentagelse kun som gyldige og positive, hvis den statistisk signifikante induktion over grænsen på 1,5 blev opnået for en ikke-cytotoksisk koncentration.

Endelig gælder det for testkemikalier, der genererer en 1,5 fold induktion eller mere allerede ved den laveste testkoncentration på 0,98 μM, at $EC_{1,5}$-værdien på < 0,98 fastsættes baseret på en visuel kontrol af dosis/respons-kurven.

Acceptkriterier

Følgende acceptkriterier bør være opfyldt ved brug af KeratinoSens™-assayet. For det første bør den induktion af luciferaseaktivitet, der er opnået med den positive kontrol, kanelaldehyd, være statistisk signifikant over en tærskel på 1,5 (f.eks. ved hjælp af en t-test) i mindst en af de testede koncentrationer (fra 4 til 64 μM).

For det andet bør $EC_{1,5}$-værdien ligge inden for to standardafvigelser af det historiske gennemsnit for testfaciliteten (f.eks. mellem 7 μM og 30 μM baseret på valideringsdatasættet), der bør ajourføres regelmæssigt. Desuden bør den gennemsnitlige induktion i de tre replikater for kanelaldehyd på 64 μM være mellem 2 og 8. Hvis sidstnævnte kriterium ikke er opfyldt, bør dosisresponsen for kanelaldehyden kontrolleres nøje, og disse test må kun accepteres, hvis der er en tydelig dosisrespons med stigende induktion af luciferaseaktivitet ved stigende koncentrationer af den positive kontrol.

Endelig bør den gennemsnitlige variationskoefficient for luminescensaflæsningen af DMSO for den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen) være under 20 % i hver gentagelse bestående af seks brønde testet i tre eksemplarer. Hvis variationen er højere, bør resultaterne kasseres.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

En KeratinoSens™-forudsigelse anses for positiv, hvis følgende fire betingelser alle er opfyldt i to ud af to eller i de samme to ud af tre gentagelser; ellers betragtes KeratinoSens™-forudsigelsen som negativ (figur 1):

1. I_{max} er større end (>) 1,5 fold og med statistisk signifikant forskellighed sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) (som blev bestemt med den tohalede uparrede Student's t-test).

2. Cellernes levedygtighed er større end (>) 70 % ved den laveste koncentration med induktion af luciferaseaktivitet over 1,5 fold (dvs. ved den $EC_{1,5}$-fastsættende koncentration).

3. $EC_{1,5}$-værdien er mindre end (<) 1 000 μM (eller < 200 μg/ml for testkemikalier uden defineret molekylvægt).

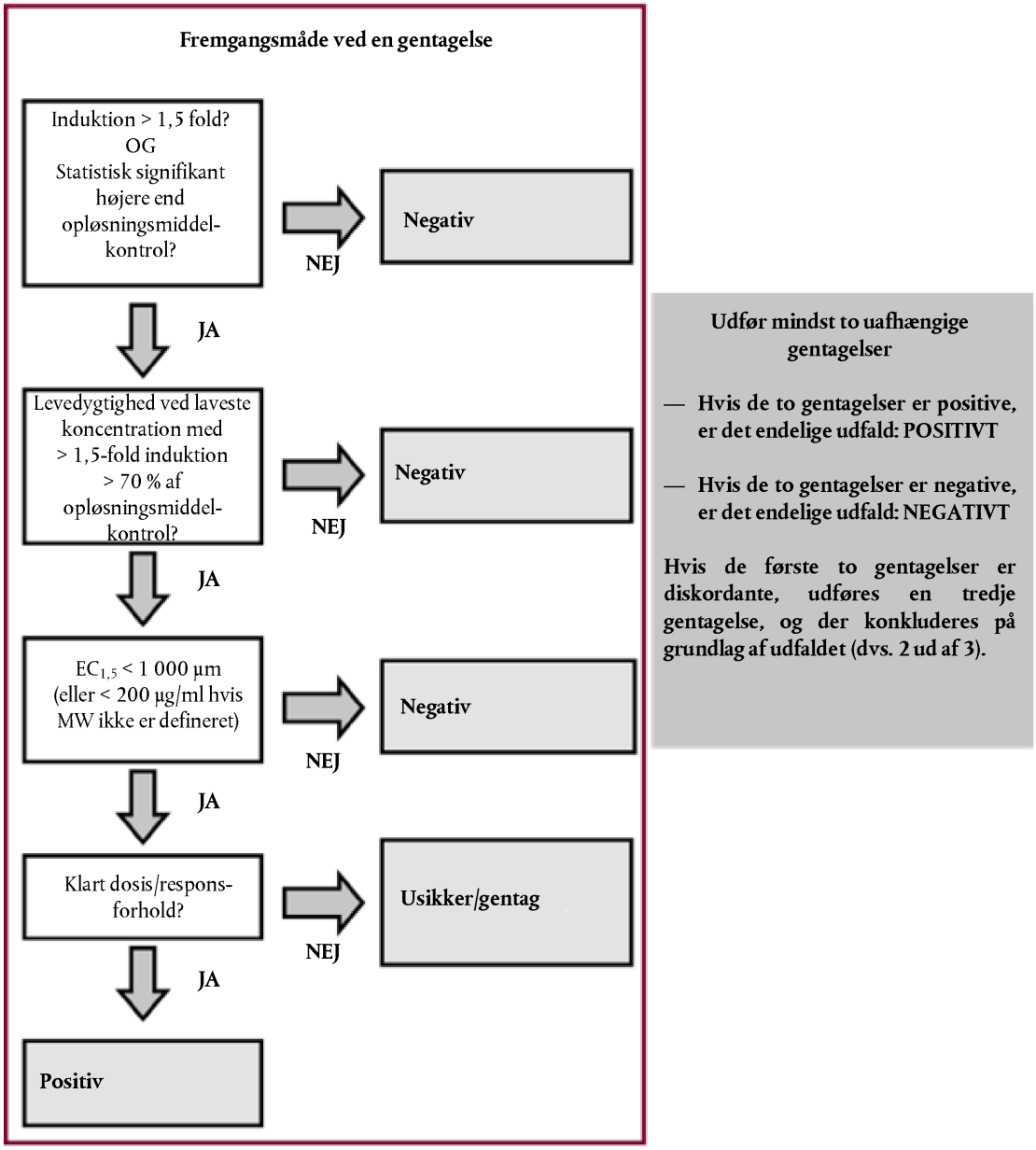
4. Der findes en tilsyneladende generel dosisrespons for luciferaseinduktion (eller en bifasisk respons som nævnt i punkt 33).

▼M7

Hvis alle de tre første betingelser er opfyldt i en given gentagelse, men der ikke kan observeres en klar dosisrespons for luciferaseinduktionen, bør resultatet af den pågældende gentagelse betragtes som usikkert, og der kan være behov for yderligere undersøgelser (figur 1). Desuden bør et negativt resultat opnået med koncentrationer < 1 000 µM (eller < 200 µg/ml for testkemikalier uden defineret molekylvægt) også betragtes som usikkert (jf. punkt 11).

Figur 1

Forudsigelsesmodel, der anvendes i KeratinoSens™-assayet. En KeratinoSens™-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11.



I sjældne tilfælde kan testkemikalier, der inducerer luciferaseaktivitet meget tæt på de cytotoksiske niveauer, være positive i nogle gentagelser ved ikke-cytotoksiske niveauer (dvs. ved $EC_{1,5}$-bestemmende koncentrationer under (<) IC_{30}), og i andre gentagelser kun ved cytotoksiske niveauer (dvs. ved $EC_{1,5}$-bestemmende koncentrationer over (>) IC_{30}). Sådanne testkemikalier testes på ny med en

▼M7

smallere dosisresponsanalyse under anvendelse af en lavere fortyndingsfaktor (f.eks. en 1,33 eller √2 (= 1,41) fold fortynding mellem brøndene) for at fastslå, om induktionen har fundet sted ved cytotoksiske niveauer eller ej (9).

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— Stof med kun en bestanddel

  — kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

  — fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

  — renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

  — eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

  — testede koncentrationer

  — opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

  — kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

  — fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

  — molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse

  — eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

  — testede koncentrationer

  — opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Kontroller

— Positiv kontrol

  — kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

  — fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant

  — renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

  — eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

  — testede koncentrationer

  — opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

▼M7

— reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for kørsel, hvis det er relevant.

— Negativ kontrol (bærestofkontrol)

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer

— renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre negative kontroller/bærestoffer end dem, der er nævnt i forsøgsmetoden, i det omfang det er muligt

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier

betingelser for forsøgsmetoden

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— beskrivelse af forsøgsmetoden

— anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, som den er hentet fra)

— antal generationer og graden af konfluens for de celler, der anvendes til test

— anvendt celletællingsmetode til udsåning inden testen, og de foranstaltninger, der er truffet for at sikre en ensartet fordeling af celleantal (jf. punkt 20)

— anvendt luminometer (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, det anvendte luciferasesubstrat og dokumentation for hensigtsmæssige luminescensmålinger baseret på kontrolprøven, der er beskrevet i tillæg 3

— den procedure, der anvendes til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Testprocedure

— antal anvendte gentagelser og replikater

— koncentrationer af testkemikaliet, tilsætningsprocedure og eksponeringstid (hvis anderledes end anbefalet)

— beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren.

Resultater

— opstilling i tabelform af I_{max}, $EC_{1,5}$ og levedygtighedsværdier (dvs. IC_{50}, IC_{30}), som er opnået for testkemikaliet og for den positive kontrol for hver gentagelse samt middelværdierne (I_{max}: gennemsnit, $EC_{1,5}$ og levedygtighedsværdier: geometrisk middelværdi) og standardafvigelse beregnet ved hjælp af data fra de enkelte gentagelser samt en angivelse af vurderingen af testkemikaliet i henhold til forudsigelsesmodellen

▼M7

— opnået variationskoefficient ved luminescensaflæsningerne for den negative kontrol for hvert forsøg

— graf, der viser dosis/respons-kurver for induktion af luciferaseaktivitet og levedygtighed

— beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

— diskussion af de resultater, der er opnået med KeratinoSens™-assayet

— vurdering af forsøgsmetodens resultater inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Kapitel B.42 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder.

(5) Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.

(6) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.

(7) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Tilgængelig på: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364:

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 213.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (29).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af interesse (2).

ARE: Antioxidantresponselement (også kaldet EpRE, electrofilresponselement) — et responselement, der findes i upstream-promotorområdet for mange cytobeskyttende gener og fase II-gener. Når det aktiveres af Nfr2, igangsætter det transskriptionsinduktionen for disse gener.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Variationskoefficient: Et mål for variation, der beregnes for en gruppe af replikationsdata ved at dividere standardafvigelsen med middelværdien. Den kan ganges med 100 for at opnå en procentsats.

$\mathbf{EC_{1,5}}$: Interpoleret koncentration for en 1,5 fold luciferaseinduktion.

$\mathbf{IC_{30}}$: Koncentration, der medfører nedsættelse af cellelevedygtigheden med 30 %.

$\mathbf{IC_{50}}$: Koncentration, der medfører nedsættelse af cellelevedygtigheden med 50 %.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

IATA (integreret tilgang til afprøvning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

I_{max}: Maksimal induktionsfaktor for luciferaseaktivitet sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) målt for en hvilken som helst koncentration af testkemikaliet.

Keap1: Kelch-lignende ECH-associeret protein 1 — et sensorprotein, der kan regulere Nrf2-aktiviteten. Under ikke-inducerede betingelser er Keap1-sensorproteinet rettet mod Nrf2-transskriptionsfaktoren ubitquitinylering og proteolytisk nedbrydning i proteasomet. Kovalent modifikation af de reaktive cysteinrester af Keap 1 med små molekyler kan føre til, at Nrf2 adskilles fra Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (1).

Stof med kun en bestanddel: Et stof, der defineres af dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (vægt/vægt).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres af dets mængdemæssige sammensætning, hvori flere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (vægt/vægt) og < 80 % (vægt/vægt). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 — en transskriptionsfaktor i antioxidantresponsvejen. Når Nrf2 ikke er ubiquitinyleret, opbygger det cytoplasmaet og forflytter sig ind i kernen, hvor det kombineres med ARE i upstream-promotorområdet hos mange cytobeskyttende gener og igangsætter deres transskription (8) (10) (11).

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (29).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (29).

Reproducerbarhed: Overensstemmelse mellem resultater af test af samme kemikalie med samme testprotokol (29).

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (29).

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Replikat, der indeholder alle bestanddele af et testsystem, undtagen testkemikaliet, men inklusive det anvendte opløsningsmiddel. Det anvendes til at bestemme basisresponsen for prøver behandlet med testkemikaliet, der er opløst i det samme opløsningsmiddel.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (29).

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (1).

Testkemikalie: Betegnelsen »testkemikalie« henviser til det, der bliver testet.

▼M7

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: En forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men kun i forbindelse med et bestemt formål (29).

▼M7

Tillæg 2

KOMPETENCESTOFFER

In vitro-hudsensibilisering: ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden

Før rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede KeratinoSens^{TM}-forudsigelse på korrekt vis for de 10 kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de $EC_{1,5}$- og IC_{50}-værdier, der falder ind under de respektive referenceområder for 1,5 ud af de 10 kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier er kommerciel tilgængelighed, tilgængelighed af in vivo-referencer af høj kvalitet og tilgængelighed af in vitro-data af høj kvalitet for KeratinoSens^{TM}-assayet.

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af KeratinoSens™-assayet

Kompetencestoffer	CASRN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ([1])	KeratinoSens™ Forudsigelse ([2])	$EC_{1,5}$ (μM)-referenceinterval ([3])	IC_{50} (μM)-referenceinterval ([3])
Isopropanol	67-63-0	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Salicylsyre	69-72-7	Fast	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Mælkesyre	50-21-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glycerol	56-81-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Kanelalkohol	104-54-1	Fast	Sensibiliserende (svagt)	Positiv	25-175	> 1 000
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Flydende	Sensibiliserende (svagt)	Positiv	5-125	> 500
2-mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast	Sensibiliserende (moderat)	Positiv	25-250	> 500
Methyldibromglutaronitril	35691-65-7	Fast	Sensibiliserende (stærkt)	Positiv	< 20	20-100
4-methylaminophenolsulfat	55-55-0	Fast	Sensibiliserende (stærkt)	Positiv	< 12,5	20-200
2,4-dinitro-chlorbenzen	97-00-7	Fast	Sensibiliserende (ekstremt)	Positiv	< 12,5	5-20

([1]) Prognoser for in vivo-fare og (styrke) er baseret på LLNA-data (13). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (24).

([2]) Man bør overveje en KeratnoSens™-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11 i denne forsøgsmetode.

([3]) På baggrund af de historiske observerede værdier (12).

▼M7

Tillæg 3

KVALITETSKONTROL AF LUMINESCENSMÅLINGER

Grundlæggende forsøg til sikring af optimale luminescensmålinger i KeratinoSens™-assayet

Følgende tre parametre er afgørende for at sikre opnåelsen af pålidelige resultater med luminometeret:

— tilstrækkelig følsomhed, der giver en stabil baggrund i kontrolbrøndene

— ingen gradient over pladen som følge af lange aflæsningstider

— ingen lysforurening af hosliggende brønde fra stærkt aktive brønde.

Inden testen anbefales det at sikre passende luminescensmålinger ved at teste en kontrolpladeopstilling som beskrevet nedenfor (tredobbelt analyse).

Pladeopstilling for første kontroltest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1 000**	**EGDMA 2 000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Blind-prøve**

EGDMA = Ethylenglycoldimethacrylat (CAS-nr.: 97-90-5, et kraftigt inducerende kemikalie

CA = kanelaldehyd, positivreference (CAS-nr.: 104-55-2)

Analysen af kvalitetskontrollen bør godtgøre:

— en klar dosisrespons i række D, med I_{max} > 20 fold over baggrundsværdien (i de fleste tilfælde opnås I_{max}-værdier mellem 100 og 300)

— ingen dosisrespons i række C og E (ingen induktionsværdi over 1,5 (helst ikke over 1,3) som følge af eventuel let baggrundsforurening, navnlig ved siden af meget aktive brønde i EGDMA-rækken

— ingen statistisk signifikant forskel mellem række A, B, C, E, F og G (dvs. ingen gradient over pladen)

— variationen bør ikke være under 20 % i nogen af rækkerne A, B, C, E, F og G og DMSO-brøndene i række H (dvs. stabil baggrund).

▼M7

B.61. FLUORESCEINUDSIVNINGS-FORSØGSMETODEN TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 460 (2012). Fluoresceinudsivnings- (FL) forsøgsmetoden er en in vitro-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger til at klassificere kemikalier (stoffer og blandinger) som øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer som defineret i De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (kategori 1), forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]) (kategori 1) og U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (Kategori I) (1)(2). Ved denne forsøgsmetode defineres stærkt øjenirriterende stoffer som kemikalier, der forårsager vævsødelæggelse i øjet efter indgivelse af testkemikaliet, som ikke er reversible inden for 21 dage, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse, mens øjenætsende stoffer er kemikalier, som forårsager irreversibel vævsødelæggelse. Disse kemikalier klassificeres som UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

Selv om FL-forsøgsmetoden ikke betragtes som værende en fuldstændig erstatning for in vivo-kaninøjentesten, anbefales det at anvende FL som del af en trindelt teststrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning. Det betyder, at FL anbefales som første trin i en top-down-tilgang til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer specifikt for begrænsede typer af kemikalier (dvs. vandopløselige stoffer og blandinger) (3) (4).

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-øjenirritationstest, som vil kunne erstatte in vivo-øjentesten (TM B.5 (5)) til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis erstatte in vivo-øjentesten (4). Det er meningen, at top-down-metoden (4) skal anvendes, når et kemikalie på grundlag af de foreliggende oplysninger forventes at være stærkt øjenirriterende.

På grundlag af den forudsigelsesmodel, der beskrives i punkt 35, kan FL-forsøgsmetoden bruges til at identificere kemikalier inden for et begrænset anvendelsesområde som øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer (UN GHS-kategori 1, EU CLP kategori 1, U.S. EPA-kategori I) uden yderligere test. Det samme forudsættes for blandinger, selv om blandinger ikke blev anvendt ved valideringen. Derfor kan FL-forsøgsmetoden anvendes til at bestemme kemikaliers evne til at fremkalde øjenirritation/ætsning i henhold til den sekventielle teststrategi i TM B.5 (5). Et kemikalie, der ikke forudses som værende øjenætsende eller stærkt øjenirriterende med FL-forsøgsmetoden, vil imidlertid skulle testes med en eller flere supplerende forsøgsmetoder (in vitro og/eller in vivo), som er i stand til præcist at identificere i) kemikalier, der in vitro er falsk negative øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer i FL-testen (UN GHS-kategori 1, EU CLP kategori 1, U.S. EPA-kategori I), ii) kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenætsende/øjenirriterende (UN GHS uden for kategori, EU CLP

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M7

uden for kategori, U.S. EPA-kategori IV) og/eller iii) kemikalier, der er moderat/mildt øjenirriterende (UN GHS-kategori 2A og 2B, EU CLP kategori 2, U.S. EPA-kategori II og III).

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle øjenætsende eller stærkt øjenirriterende virkning som målt ved dets evne til at inducere skade på et impermeabelt, konfluerende epitelmonolag. Integriteten af transepitelpermeabilitet er en vigtig funktion ved et epitel som det, der findes i conjunctiva og cornea. Transepitelpermeabilitet styres af forskellige »tight junctions«. Øget permeabilitet af cornea-epitelet in vivo har vist sig at korrelere med inflammationsniveauet og observerede overfladeskader, efterhånden som øjenirritationen udvikler sig.

Ved FL-forsøgsmetoden måles toksiske virkninger efter en kort eksponeringstid for testkemikaliet i form af en stigning i permeabiliteten af natriumfluorescein gennem epitelmonolaget af Madin-Darby-hundenyreceller (MDCK) dyrket på permeable indsatser. Størrelsen af den opståede fluoresceinudsivning er proportional med den kemikalieinducerede beskadigelse af tight junctions, desmosomer og cellemembraner og kan anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle øjenætsende toksicitet. Tillæg 1 indeholder et diagram over MDCK-celler dyrket på en indsatsmembran til FL-forsøgsmetoden.

Definitioner findes i tillæg 2.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på INVITTOX-protokol nr. 71 (6), som er blevet evalueret i en international valideringsundersøgelse foretaget af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) i samarbejde med US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM).

FL-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af kemikalier, der skal klassificeres som let/moderat øjenirriterende stoffer, eller til kemikalier, der ikke skal klassificeres som øjenirriterende (stoffer og blandinger) (dvs. GHS-kategori 2A/2B, uden for kategori, EU CLP-kategori 2, uden for kategori, US EPA-kategori II/III/IV), som fremgår af valideringsundersøgelsen (3) (7).

Forsøgsmetoden kan kun anvendes til vandopløselige kemikalier (stoffer og blandinger). Det stærkt øjenirriterende potentiale ved kemikalier, som er vandopløselige, og/eller hvis toksiske virkning ikke påvirkes af fortynding, forudsiges generelt nøjagtigt med FL-forsøgsmetoden (7). For at et kemikalie kan kategoriseres som vandopløseligt under forsøgsbetingelser, skal det være opløseligt i en steril calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en koncentration på $\geq$ 250 mg/ml (en dosis over grænseværdien på 100 mg/ml). Men hvis testkemikaliet er opløseligt under koncentrationen 100 mg/ml, men allerede inducerer en FL-induktion på 20 % ved denne koncentration (dvs. FL_{20} < 100 mg/ml), kan det stadig klassificeres som GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I.

De konstaterede begrænsninger ved denne forsøgsmetode udelukker stærke syrer og baser, cellefiksativer og meget flygtige kemikalier fra anvendelsesområdet. Disse kemikalier har mekanismer, som ikke måles med FL-forsøgsmetoden, f.eks. kraftig koagulering, forsæbning eller specifikke reaktionsegenskaber. Andre identificerede begrænsninger for denne metode er baseret på resultaterne for forudsigelsesevnen for farvede og viskøse testkemikalier (7). Det anføres, at begge typer kemikalier er vanskelige at fjerne fra monolaget efter kortvarig

▼M7

eksponering, og at forsøgsmetodens forudsigelsesevne kan forbedres, hvis der anvendes et stort antal vaskninger. Faste kemikalier i suspension i væsker er tilbøjelige til at udfældes, og slutkoncentrationen i cellerne kan være vanskelig at fastslå. Når kemikalier i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres FL's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (7).

Som følge af formålet med denne forsøgsmetode (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-raterne (jf. punkt 13) ikke kritiske, eftersom sådanne kemikalier efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test eller i kaniner, alt efter de forskriftsmæssige krav, med anvendelse af en sekventiel teststrategi med en »weight of evidence«-tilgang (5) (jf. også punkt 3 og 4).

Andre identificerede begrænsninger ved FL-forsøgsmetoden skyldes andelen af falsk negative og falsk positive resultater. Når andelen af falsk positive resultater blev anvendt som første trin i en top-down-metode til at identificere vandopløselige øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer og blandinger (UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1, U.S. EPA-kategori I), varierede den ved FL-forsøgsmetoden fra 7 % (7/103, UN GHS og EU CLP) til 9 % (9/99, U.S. EPA), og andelen af falsk negative resultater varierede fra 54 % (15/28, U.S. EPA) til 56 % (27/48, UN GHS og EU CLP) sammenlignet med in vivo-resultater. Kemikaliegrupper, der udviser falsk positive og/eller falsk negative resultater i FL-forsøgsmetoden, defineres ikke her.

Visse tekniske begrænsninger er specifikke for MDCK-cellekulturen. De tight junctions, der blokerer natriumfluorescein-farvestoffets passage gennem monolaget, ødelægges stadig mere med et stigende antal cellegenerationer. Ufuldstændig dannelse af tight junctions resulterer i øget FL i den ikke-behandlede kontrol. Det er derfor vigtigt med en defineret tilladt maksimal udsivning i de ubehandlede kontroller (se punkt 38: 0 % udsivning). Som det er tilfældet med alle in vitro-assays, er det muligt, at cellerne forandres over tid, og derfor er det afgørende, at generationernes nummerserier for assays angives.

Det nuværende anvendelsesområde kan udvides i nogle tilfælde, men først efter analyse af et udvidet datasæt for de undersøgte testkemikalier, helst opnået gennem test (3). Denne forsøgsmetode vil blive opdateret efter behov, i takt med at nye oplysninger og data behandles.

Ethvert laboratorium bør, når det begynder at bruge dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 3. Laboratorier kan benytte disse kemikalier til at godtgøre deres tekniske kompetence vedrørende brug af FL-forsøgsmetoden, inden de påbegynder fremsendelse af FL-assaydata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

FL-forsøgsmetoden er et in vitro-assay baseret på cytotoksicitet og cellefunktion, der udføres på et sammenflydende monolag af rørformede MDCK CB997-epitelceller, der er dyrket på semipermeable indsatser, og som modellerer den ikke-formerende tilstand af cornea-epitelet in vivo. MDCK-cellelinjen er veletableret og danner tight junctions og desmosomer svarende til dem, der findes på den apikale side af conjunctiva- og cornea-epitel. Tight junctions og desmosomer in vivo forhindrer, at opløste stoffer og fremmede stoffer trænger ind i cornea-epitelet. Tab af trans-epitel-uigennemtrængelighed på grund af beskadigede tight junctions og desmosomer er en af de tidlige begivenheder ved kemikalieinduceret øjenirritation.

▼M7

Testkemikaliet påføres det sammenflydende lag af celler, der dyrkes på den apikale side af indsatsen. En kortvarig eksponering på 1 minut anvendes rutinemæssigt til at afspejle det normale tidsrum for menneskers eksponering. En fordel ved den korte eksponeringstid er, at vandbaserede stoffer og blandinger kan testes i ren form, såfremt de let kan fjernes efter eksponeringsperioden. Dette giver mulighed for mere direkte sammenligninger af resultaterne med de kemiske virkninger hos mennesker. Herefter fjernes testkemikaliet, og det ikketoksiske, stærkt fluorescerende natriumfluorescein-farvestof påføres den apikale side af monolaget i 30 minutter. Skaden, som testkemikaliet forårsager på tight junctions, bestemmes af mængden af fluorescein, der siver gennem cellelaget inden for en nærmere afgrænset periode.

Mængden af natriumfluorescein-farvestoffet, der passerer gennem monolaget og indsatsmembranen i en bestemt mængde af opløsningen i brønden (som natriumfluorescein-farvestoffet siver ud i) bestemmes ved spektroflourometrisk måling af fluoresceinkoncentrationen i brønden. Størrelsen af fluorescein-udsivningen (FL) beregnes i forhold til fluorescensintensitets- (FI) aflæsningerne fra to kontroller: en blindprøve og en kontrol for den maksimale udsivning. Den procentvise udsivning og dermed omfanget af skaden på tight junctions angives i forbindelse med disse kontroller for hver af de fastlagte koncentrationer af testkemikaliet. Derefter beregnes FL_{20} (dvs. den koncentration, der forårsager 20 % FL i forhold til den værdi, der registreres for det ubehandlede, sammenflydende enkeltlag og indsatser uden celler). Værdien FL_{20} (mg/ml) bruges i forudsigelsesmodellen til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer (se punkt 35).

Restitutionen er en vigtig del af et testkemikalies toksicitetsprofil, som også vurderes ved hjælp af in vivo-testen af øjenirritation. Foreløbige analyser viste, at restitutionsdata (op til 72 timer efter kemikalieeksponeringen) vil kunne vanskeliggøre forudsigelsesevnen for INVITTOX Protocol 71, men der er behov for yderligere evaluering, og det vil være hensigtsmæssigt med flere data, helst opnået ved yderligere test (6). Denne forsøgsmetode vil blive opdateret efter behov, i takt med at nye oplysninger og data behandles.

FREMGANGSMÅDE

Præparering af cellemonolaget

Monolaget af MDCK CB997-celler præpareres med sub-konfluente celler dyrket i celledyrkningskolber i DMEM/næringsstofblandingen F12 (1x-koncentrat med L-glutamin, 15 mM HEPES, calcium (i en koncentration på 1,0-1,8 mM) og 10 % varme-inaktiverede FCS/FBS). Det er vigtigt, at alle medier/opløsninger, der anvendes i hele FL-assayet, indeholder calcium i en koncentration på mellem 1,8 mM (200 mg/l) og 1,0 mM (111 mg/l) for at sikre dannelse af tight junctions og disses integritet. Intervallet af cellegenerationer bør kontrolleres for at sikre ensartet og reproducerbar dannelse af tight junctions. Cellerne skal helst ligge inden for generationsintervallet 3-30 efter optøning, fordi celler i dette generationsinterval har en ensartet funktionalitet, hvilket gør det nemmere at reproducere analyseresultaterne.

Før FL-forsøgsmetoden anvendes, adskilles celler fra kolben ved trypsinering og centrifugeres, hvorefter en passende mængde celler podes på indsatser, der er anbragt i plader med 24 brønde (se tillæg 1). 12 mm indsatser med en membran af blandede celluloseestere, en tykkelse på 80-150 μm og en porestørrelse på 0,45 μm anvendes til udsåning af cellerne. I valideringsundersøgelsen benyttede man Millicell-HA 12 mm-indsatser. Indsatsens egenskaber og membrantypen er vigtige, da disse kan påvirke cellevæksten og kemikaliebindingen. Visse typer af kemikalier kan binde sig til Millicell-HA-indsatsmembranen, hvilket kan få indflydelse på fortolkningen af resultaterne. Kompetencekemikalier (se tillæg 3) bør anvendes til at påvise ækvivalensen, hvis der anvendes andre membraner.

▼M7

Kemikaliebinding til indsatsmembranen er mere almindelig for kationiske kemikalier som benzalkoniumchlorid, der tiltrækkes af den ladede membran (7). Kemisk binding til indsatsmembranen kan øge den kemiske eksponeringsperiode og føre til en overvurdering af kemikaliets toksiske potentiale, men kan også fysisk reducere udsivningen af fluorescein gennem indsatsen ved at binde farvestoffet til det kationiske kemikalie, der er bundet til indsatsmembranen, hvilket vil føre til en undervurdering af kemikaliets toksiske potentiale. Dette kan let kontrolleres ved kun at eksponere membranen for den højeste koncentration af det testede kemikalie og herefter tilføje farvestoffet natriumfluorescein i den normale koncentration i standardtidsrummet (ingen cellekontrol). Hvis der indtræder binding af natriumfluorescein-farvestoffet, får indsatsmembranen en gul farve, når testmaterialet er vasket af. Det er derfor vigtigt kende testkemikaliets bindingsegenskaber for at kunne fortolke kemikaliets indvirkning på cellerne.

Cellepodning på indsatserne skal frembringe et sammenflydende monolag på tidspunktet for den kemiske eksponering. $1{,}6 \times 10^5$ celler tilføjes pr. indsats (400 µl af en cellesuspension med en densitet på 4×10^5 celler/ml). Under disse omstændigheder opnås et sammenflydende monolag normalt efter 96 timers dyrkning. Indsatserne bør undersøges visuelt før podning for at sikre, at eventuelle skader, der konstateres ved den visuelle kontrol, som beskrives i punkt 30, skyldes håndtering.

MDCK-cellekulturer bør opbevares i inkubatorer i en fugtig atmosfære ved 5 % ± 1 % CO_2 og 37 ± 1 °C. Cellerne skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Påføring af test- og kontrolkemikalier

Der fremstilles en ny stamopløsning af testkemikaliet til hvert forsøg, og den bør anvendes inden for 30 minutter efter fremstillingen. Testkemikalierne præpareres i en calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS for at undgå proteinbinding i serummet. Kemikaliets opløselighed ved 250 mg/ml i HBSS vurderes inden testen. Hvis kemikaliet danner en stabil suspension eller emulsion (dvs. bevarer ensartetheden og ikke bundfældes eller skilles i mere end en fase) i løbet af 30 minutter ved denne koncentration, kan HBSS stadig bruges som opløsningsmiddel. Men hvis det viser sig, at kemikaliet er uopløseligt i HBSS ved denne koncentration, bør man overveje at anvende andre forsøgsmetoder i stedet for FL. Brugen af let mineralolie som opløsningsmiddel i de tilfælde, hvor det viser sig, at kemikaliet er uopløseligt i HBSS, bør ske med forsigtighed, da der ikke foreligger tilstrækkelige data til at udlede konklusioner vedrørende FL-assayets ydeevne under sådanne forhold.

Alle kemikalier, der skal testes, præpareres i en steril calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS fra stamopløsningen i fem fastlagte koncentrationer fortyndet efter volumenvægt: 1, 25, 100, 250 mg/ml og en ren eller en mættet opløsning. Ved test af et fast kemikalie medtages der en meget høj koncentration på 750 mg/ml. Denne koncentration af kemikaliet skal muligvis påføres cellerne med en pipette med positiv fortrængning. Hvis det konstateres, at toksiciteten ligger mellem 25 og 100 mg/ml, bør følgende yderligere koncentrationer testes to gange: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20}-værdien udledes af disse koncentrationer, hvis acceptkriterierne er opfyldt.

Testkemikalierne tilsættes de sammenflydende cellemonolag efter fjernelse af dyrkningsmediet og to gange vask med sterilt, varmt (37 °C) calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri HBSS. Forinden er filtrene kontrolleret visuelt for alle eksisterende skader, der fejlagtigt kunne tilskrives potentiel uforenelighed med testkemikalierne. Der anvendes mindst tre replikater for hver koncentration af testkemikaliet og til kontrollerne i hver kørsel. Efter 1

▼M7

minuts eksponering ved stuetemperatur fjernes testkemikaliet forsigtigt ved opsugning, monolaget vaskes to gange med steril, varm (37 °C) calciumholdigt (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri HBSS, og fluoresceinudsivningen måles med det samme.

Samtidige negative (NC) og positive kontroller (PC) bruges til at påvise, at monolagets integritet (NC) og cellernes følsomhed (PC) ligger inden for et forudfastsat acceptinterval. Det foreslåede PC-kemikalie er Brij 35 (CAS-nr. 9002-92-0) ved 100 mg/ml. Denne koncentration giver en fluoresceinudsivning på omkring 30 % (acceptabelt interval 20-40 % fluoresceinudsivning, dvs. skader på cellelaget). Det foreslåede NC-kemikalie er calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS (ubehandlet, blindprøve). Der medtages også en maksimal udsivning i hver kørsel for at gøre det muligt at beregne FL_{20}-værdier. Den maksimale udsivning bestemmes ved hjælp af en kontrolindsats uden celler.

Bestemmelse af fluoresceinpermeabilitet

Umiddelbart efter fjernelse af test- og kontrolkemikalierne tilsættes 400 µl 0,1 mg/ml-fluoresceinopløsning (0,01 % (vægt/volumen) i calciumholdig [i en koncentration på 1,0-1,8 mM], phenolrødt-fri HBSS) til indsatserne (f.eks. Millicell-HA). Kulturerne opbevares ved stuetemperatur i 30 minutter. Ved afslutningen af inkuberingen med fluorescein fjernes indsatserne forsigtigt fra hver brønd. Der foretages visuel kontrol af hvert filter, og eventuelle skader, der måtte være opstået under håndteringen, registreres.

Mængden af fluorescein, der er sevet gennem monolaget og indsatsen, bestemmes i den opløsning, som blev tilbage i brøndene efter fjernelse af indsatserne. Målingerne foretages i et spektrofluorometer ved excitations- og emissionsbølgelængder på henholdsvis 485 nm og 530 nm. Spektrofluorometerets følsomhed indstilles, så man opnår den højeste numeriske forskel mellem det maksimale FL (indsats uden celler) og det minimale FL (indsats med sammenflydende monolag behandlet med NC). På grund af forskelle mellem de anvendte spektrofluorometre anbefales det at anvende en følsomhed, som giver en fluorescensintensitet > 4 000 ved kontrol af den maksimale fluoresceinudsivning. Den maksimale FL-værdi må ikke være højere end 9 999. Den maksimale intensitet af fluorescensudsivningen bør ligge inden for det anvendte spektrofluorometers lineære rækkevidde.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

Mængden af FL er proportional med de kemikalieinducerede skader på tight junctions. FL-procenten for hver af de testede koncentrationer af kemikaliet beregnes ud fra de opnåede FL-værdier for testkemikaliet med henvisning til FL-værdier fra NC (aflæsning for sammenflydende monolag af celler behandlet med NC) og kontrollen for den maksimale udsivning (aflæsning for FL-mængden gennem en indsats uden celler).

Den gennemsnitlige maksimale fluorescensintensitet = x

Den gennemsnitlige maksimale procentvise fluorescensintensitet (NC) = y

Den gennemsnitlige 100 %-udsivning opnås ved at trække den gennemsnitlige 0 %-udsivning fra den gennemsnitlige maksimale udsivning,

dvs. $x - y = z$

Den procentvise udsivning for hver af de fastsatte doser opnås ved at trække 0 %-udsivningen fra den gennemsnitlige fluorescensintensitet for de tre replikataflæsninger (m) og dividere denne værdi med 100 %-udsivningen, dvs. $\% FL = [(m-y) / z] \times 100$ %, hvor:

▼M7

m = middelværdien for fluorescensintensiteten for de tre replikatmålinger for den pågældende koncentration

% FL = procentdelen af fluorescein, der siver gennem cellelaget

Følgende ligning til beregning af den kemiske koncentration, der forårsager 20 % FL, anvendes:

$$FL_D = [\ (A\text{-}B)\ /\ (C\text{-}B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

hvor

D = % hæmning

A = % skader (20 % fluoresceinudsivning)

B = % fluoresceinudsivning < A

C = % fluoresceinudsivning > A

M_C = koncentration (mg/ml) af C

M_b = koncentration (mg/ml) af B

Tærskelværdien for FL_{20} for forudsigelse af, hvorvidt kemikalier er øjenætsende/stærkt øjenirriterende er anført nedenfor:

FL_{20} (mg/ml)	UN GHS C&L	EU CLP C&L	U.S. EPA C&L
≤ 100	Kategori 1	Kategori 1	Kategori I

C&L: klassificering og mærkning

FL-forsøgsmetoden anbefales kun til identifikation af vandopløselige øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer (UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1, U.S. EPA-kategori I) (se punkt 1 og 10).

Med henblik på at identificere vandopløselige kemikalier (stoffer og blandinger) (3) (6) (7), som »medfører alvorlig øjenskade« (UN GHS/EU CLP-kategori 1), eller som er »øjenætsende eller stærkt øjenirriterende« (U.S. EPA-kategori I), skal testkemikaliet inducere en FL_{20}-værdi på ≤ 100 mg/ml.

Accept af resultater

Den gennemsnitlige maksimale værdi for fluoresceinudsivning (x) skal være højere end 4 000 (se punkt 31), den gennemsnitlige 0 %-udsivning (y) skal være mindre end eller lig med 300, og 100 %-udsivningen (z) skal ligge mellem 3 700 og 6 000.

En test anses for acceptabel, hvis den positive kontrol medførte 20 % til 40 % skade på cellelaget (målt som % fluoresceinudsivning).

DATA OG RAPPORTERING

Data

For hver analyseserie bør data fra de enkelte replikatbrønde (f.eks. værdier for fluorescensaktivitet og beregnede procentvise FL-data for hvert testkemikalie samt dets klassificering) fremlægges i tabelform. Desuden bør gennemsnit og standardafvigelse for individuelle gentagne målinger i hver kørsel rapporteres.

▼M7

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolkemikalier

— kemisk(e) navn(e) såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes

— kemikaliets CAS-nummer, hvis dette er kendt

— renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige

— fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen (f.eks. fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, opløselighed i vand, kemikaliegruppe)

— eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaringsforhold.

Begrundelse for den anvendte forsøgsmetode og protokol

— bør indeholde overvejelser vedrørende anvendelsesområde og forsøgsmetodens begrænsninger.

Testbetingelser

— beskrivelse af det anvendte cellesystem, herunder ægthedscertifikatet og mycoplasmastatus for cellelinjen

— detaljer om den anvendte testprocedure

— de(n) anvendte koncentration(er) af testkemikaliet

— varighed af eksponering for testkemikaliet

— varighed af inkuberingen med fluorescein

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier

— reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, referencekemikalier, hvis dette er relevant)

— oplysninger om den tekniske kompetence, som laboratoriet har dokumenteret.

Resultater

— Opstilling i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie, for kontrollerne i hver kørsel og fra hver flergangsbestemmelse (inklusive individuelle resultater, gennemsnit og standardafvigelser)

— de(n) afledte klassificering(er) med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller beslutningskriterier

— beskrivelse af andre observerede virkninger.

▼**M7**

Diskussion af resultaterne

— Bør omfatte overvejelser vedrørende et usikkert resultat (punkt 35: FL_{20} > 100 mg/ml) og yderligere undersøgelser

Konklusioner

LITTERATUR

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1 Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Tilgængelig på: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/]

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

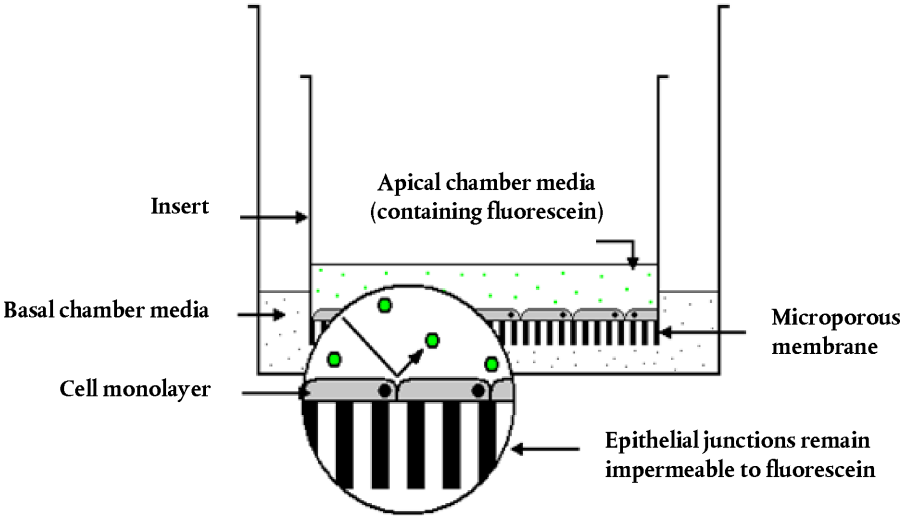
(8) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. OECD, Paris.

▼M7

Tillæg 1

DIAGRAM OVER MDCK-CELLER DYRKET PÅ EN INDSATSMEMBRAN TIL FL-FORSØGSMETODEN

Et sammenflydende lag MDCK-celler dyrkes på en semipermeabel membran fra en indsats. Indsatserne placeres i plader med 24 brønde.



Figur hentet fra: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Tillæg 2

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

EPA-kategori I: Kemikalier, der forårsager ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller cornea-beskadigelse eller -irritation, som persisterer i mere end 21 dage (2).

EU CLP (forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger): Gennemfører FN's globalt harmoniserede system for klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) (GHS) i Den Europæiske Union (EU).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

FL_{20}: Kan vurderes ved bestemmelse af den koncentration, hvor testkemikaliet forårsager 20 % af fluoresceinudsivningen gennem cellelaget.

Fluoresceinudsivning: Mængden af fluorescein, der passerer gennem cellelaget, målt med spektrofluorometri.

De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø.

GHS-kategori 1: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Blanding: Brugt i forbindelse med UN GHS som en blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer.

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

▼M7

Ikke klassificeret: Kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, 2A eller 2B, EU CLP-kategori 1 eller 2 eller U.S. EPA-kategori I, II eller III.

Øjenætsende stof: a) kemikalie, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

Øjenirriterende stof: a) kemikalie, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter påføring på øjets anteriore overflade; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 2A eller 2B, EU CLP-kategori 2 eller U.S. EPA-kategori, II eller III.

Stærkt øjenirriterende stof: a) kemikalie, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter påføring på øjets anteriore overflade, som ikke er reversibel inden for 21 dage efter påføring, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, EPA-kategori I, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

Positiv kontrol: Replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et kemikalie, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Kompetencekemikalier: Undergruppe af listen over referencekemikalier, der kan anvendes af et uerfarent laboratorium til at dokumentere fortrolighed med den validerede forsøgsmetode.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (8).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Erstatningstest: Test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (8).

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når

▼M7

denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans.

Stof: Anvendes i forbindelse med UN GHS om grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvise teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (8).

»**Weight-of-the-evidence**«: Proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

▼M7

Tillæg 3

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL FL-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsningsklassificeringen for de otte anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjenirritation/-ætsning, som er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405, TM B.5(5)) (dvs. stoffer, der befinder sig i UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for klassificering). Hvad angår den validerede anvendelighed af FL-assayet (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier er, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for FL-forsøgsmetoden. Derfor blev kompetencekemikalierne udvalgt fra »Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing« (8), som blev anvendt til den retrospektive validering af FL-forsøgsmetoden.

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelsen af FL

Kemikalie	CASNR	Kemikaliegruppe (1)	Fysisk form	In vivo-klassificering (2)	In vitro-klassificering (3)
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Promethazinhydrochlorid	58-33-3	Amin/amidin, heterocyklisk organisk svovlforbindelse	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Natriumhydroxid (10 %)	1310-73-2	Alkali	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Natriumlaurylsulfat (15 %)	151-21-3	Carboxylsyre (salt)	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
4-carboxy-benzaldehyd	619-66-9	Carboxylsyre, aldehyd	Fast	Kategori 2(A)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2(A)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ethyl-2-methylaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2(B)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Uden for kategori	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof

Forkortelser: CASNR = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: http://www.nlm.nih.gov/mesh)

(2) Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405, TM B.5) og brug af UN GHS og EU CLP.

(3) Baseret på resultater, der er opnået med FL (INVITTOX protokol nr. 71(6))

▼M7

B.62. ALKALISK *IN VIVO*-KOMETASSAY MED PATTEDYR

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 489 (2016). Det alkaliske in vivo-kometassay (gelelektroforese på enkeltceller — i det følgende blot benævnt kometassayet) anvendes til at konstatere brud på DNA-strenge i celler eller kerner, der er isoleret fra flere vævstyper fra dyr, sædvanligvis gnavere, der har været eksponeret for potentielt genotoksisk(e) materiale(r). Kometassayet er blevet gennemgået af forskellige ekspertgrupper, som også har fremsat anbefalinger (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (11).

Formålet med kometassayet er at identificere kemikalier, der forårsager DNA-skader. I et basisk miljø (> pH 13) kan kometassayet registrere brud på enkelt- og dobbeltstrenge, der f.eks. skyldes direkte interaktion med DNA, alkali-labile steder eller en række forbigående brud på DNA-strenge som følge af reparation af DNA-overskæring. Disse brud på strengene kan repareres, hvilket betyder, at der ikke opstår nogen vedvarende virkning, kan være dødelige for cellen eller kan repareres til en mutation, der medfører en permanent, men dog levedygtig forandring. De kan også føre til kromosomskader, som ligeledes er forbundet med mange sygdomme hos mennesker, herunder kræft.

Et formelt valideringsforsøg af in vivo-kometassayet for gnavere blev udført i 2006-2012 og blev koordineret af Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) og NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (12). Forsøgsmetoden omfatter kometassayets anbefalede anvendelse og begrænsninger og er baseret på den endelige protokol (12), der anvendes ved valideringstesten, og på yderligere relevante offentliggjorte og ikke-offentliggjorte data (som tilhører laboratorier).

Definitioner af nøgletermer findes i tillæg 1. Det bemærkes, at mange forskellige platforme kan bruges til dette assay (objektglas, gelpletter, plader med 96 brønde osv.). For nemheds skyld anvendes betegnelsen »objektglas« i hele den resterende del af dette dokument, men det omfatter alle de øvrige platforme.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Kometassayet en metode til måling af brud på DNA-strenge i eukaryote celler. Enkeltceller/-kerner indlejret i agarose på et objektglas lyseres med et rengøringsmiddel og høj saltkoncentration. Ved dette lyseringstrin fjernes celle- og kernemembranerne, hvilket giver mulighed for frigivelse af DNA-spiraler, normalt kaldet nukleoider, og DNA-fragmenter. Elektroforese ved høj pH skaber strukturer, der ligner kometer, og som ved hjælp af hensigtsmæssig fluorescerende farvning kan observeres ved fluorescensmikroskopi; DNA-fragmenterne bevæger sig væk fra »hovedet« og ned i »halen« i henhold til deres størrelse, og komethalens intensitet i forhold til den samlede intensitet (hoved plus hale) afspejler omfanget af DNA-brud (13) (14) (15).

Det basiske in vivo-kometassay er særlig relevant til vurdering af genotoksisk fare, idet assayets respons afhænger af in vivo-ADME (absorption, distribution, metabolisme og ekskretion), og ligeledes af DNA-reparationsprocesserne. Disse kan variere mellem arter, væv og typerne af DNA-skader.

▼M7

For at opfylde kravene til dyrevelfærd, navnlig reduktionen i brugen af forsøgsdyr (princippet om de tre R'er — Replacement, Reduction, Refinement), kan dette assay også integreres med andre toksikologiske undersøgelser, f.eks. undersøgelser af toksicitet ved gentagen dosis (10) (16) (17), eller endepunktet kan kombineres med andre genotoksicitetsendepunkter, f.eks. in vivo-assayet for mikrokernetest i erythrocytter hos pattedyr (18) (19) (20). Kometassayet udføres oftest på gnavere, selv om det også har været anvendt på andre arter af både pattedyr og ikkepattedyr. Brug af arter, der ikke er gnavere, bør begrundes videnskabeligt og etisk i hvert enkelt tilfælde, og det anbefales på det kraftigste, at kometassayet kun udføres på andre arter end gnavere som et led i en anden toksicitetsundersøgelse og ikke som en selvstændig test.

Udvælgelse af eksponeringsvej og de vævstyper, der skal undersøges, bør fastlægges på grundlag af al foreliggende/eksisterende viden om testkemikalierne, f.eks. tilsigtet/forventet eksponeringsvej for mennesker, metabolisme og fordeling, potentiale for virkninger på kontaktstedet, strukturelle alarmer, andre data for genotoksicitet eller toksicitet samt formålet med forsøget. Når det er relevant, kan man undersøge kemikaliernes genotoksiske potentiale i målvævet/målvævene med hensyn til kræftfremkaldende og/eller andre toksiske virkninger. Assayet betragtes også som nyttigt til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der konstateres i et in vitro-system. Det er hensigtsmæssigt at udføre et in vivo-kometassay i et væv af interesse, når man med rimelighed kan forvente, at eksponeringen af det pågældende væv vil være tilstrækkelig.

Assayet er blevet valideret mest grundigt i somatisk væv fra hanrotter i ringtest, såsom JaCVAM-forsøg (12) og i Rothfuss et al., 2010 (10). Lever og mavesæk blev anvendt i den internationale JaCVAM-valideringstest. Leveren, fordi den er det mest aktive organ ved fordøjelsen af kemikalier og ofte også et målorgan for carcinogenicitet. Mavesækken, fordi det er normalt er første kontaktsted for kemikalier ved oral eksponering, selv om andre områder i mave-tarmkanalen såsom duodenum og jejunum også bør betragtes som kontaktstedsvæv og kan anses for mere relevante for mennesker end gnaveres kirtelmaver. Det bør sikres, at sådant væv ikke udsættes for uforholdsmæssigt høje koncentrationer af testkemikaliet (21). Teknikken gælder i princippet for alt væv, som kan bruges til at udlede analyserbare enkeltcelle/-kernesuspensioner. Proprietære data fra flere laboratorier viser, at den kan anvendes til mange forskellige slags væv med gode resultater, og mange publikationer viser teknikkens anvendelighed til andre organer eller andet væv end lever og mavesæk, f.eks. jejunum (22), nyre (23) (24), hud (25) (26) eller urinblære (27) (28), lunger og udskyllede bronchoalveolære celler (relevant for undersøgelser af inhalerede kemikalier) (29) (30), og der er desuden foretaget test af flere organer (31) (32).

Selv om der kan være interesse i genotoksiske virkninger i kimceller, skal det bemærkes, at det basiske standardkometassay som beskrevet i denne forsøgsmetode ikke anses for hensigtsmæssigt til måling af DNA-strengbrud i modne kønsceller. Eftersom der blev rapporteret om høje og variable baggrundsniveauer i DNA-skader ved en gennemgang af litteraturen om brug af kometassayet til kimcelle-genotoksicitet (33), anses det for nødvendigt med protokolændringer kombineret med forbedret standardisering og valideringsundersøgelser, før kometassayet på modne kønsceller (f.eks. sæd) kan indgå i forsøgsmetoden. Desuden er den anbefalede eksponering, der beskrives for denne forsøgsmetode, ikke optimal, og der er behov for længere eksponerings- eller prøveudtagningstider for at nå frem til en meningsfuld analyse af DNA-strengbrud i modne sædceller. Genotoksiske virkninger, som måles med kometassayet i testikelcellerne på forskellige differentieringsstadier, findes beskrevet i litteraturen (34) (35). Det skal dog bemærkes, at gonader indeholder en blanding af somatiske celler og kimceller. Derfor afspejler positive resultater i hele gonaden (testis) ikke nødvendigvis kimcelleskader, men de indikerer ikke desto mindre, at de(t) testede kemikalie(r) og/eller dets metabolitter har nået gonaden.

▼M7

Man kan ikke pålideligt påvise krydsforbindelser med standardforsøgsbetingelserne for kometassayet. Ved visse ændrede forsøgsbetingelser kan man muligvis konstatere DNA-DNA- og DNA-protein-krydsforbindelser og andre baseændringer såsom oxiderede baser (23) (36) (37) (38) (39). Der er imidlertid behov for yderligere undersøgelser for at nå frem til en korrekt karakterisering af de nødvendige protokolændringer. Dermed er påvisning af krydsforbindelsesfaktorer ikke det primære formål med assayet som beskrevet her. Assayet er ikke egnet til at identificere aneugener, selv ikke efter ændringerne.

På baggrund af det aktuelle videnniveau er der adskillige yderligere begrænsninger (se tillæg 3) forbundet med in vivo-kometassayet. Det forventes, at forsøgsmetoden vil blive revideret på et senere tidspunkt og om nødvendigt ændret på baggrund af de indhøstede erfaringer.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

METODENS PRINCIP

Dyrene eksponeres for testkemikaliet på passende vis. Punkt 36-40 indeholder en detaljeret beskrivelse af dosering og prøveudtagning. På de(t) valgte prøveudtagningstidspunkt(er) fridissekeres vævet af interesse, og der fremstilles suspensioner af celler/kerner (in situ-perfusion kan udføres, når det anses for nyttigt, f.eks. lever), som indlejres i blød agar for at immobilisere dem på objektglassene. Cellerne/kernerne behandles med lysisbuffer for at fjerne celle- og/eller kernemembranen og udsættes for en stærk base (f.eks. pH $\geq$ 13) med henblik på at udfolde DNA'et og frigive udrettede DNA-spiraler og -fragmenter. Kernens DNA i agaret udsættes herefter for elektroforese. Almindelige ikke-fragmenterede DNA-molekyler forbliver i den position, som kernens DNA havde i agaret, mens eventuelt fragmenteret DNA og udrettede DNA-spiraler vil vandre mod anoden. Efter elektroforese undersøges DNA'et visuelt ved hjælp af en hensigtsmæssig fluorescerende farvning. Præparater bør analyseres med mikroskop og fuld- eller halvautomatiske billedanalysesystemer. Mængden af DNA, der er vandret under elektroforesen, og den vandrede afstand afspejler antallet og størrelsen af DNA-fragmenterne. Der findes adskillige endepunkter for kometassayet. DNA-indholdet i halen (den procentvise DNA-intensitet i komethalen eller procentvise haleintensitet) anbefales til brug ved vurdering af DNA-skaderne (12) (40) (41) (42). Efter analyse af et tilstrækkeligt antal kerner analyseres dataene med hensigtsmæssige metoder for at vurdere resultaterne af assayet.

Det skal bemærkes, at man har undersøgt ændringer af forskellige aspekter af metodologien, herunder prøvefremstilling, elektroforesebetingelser, parametre for visuel analyse (f.eks. farvningsintensitet, mikroskoppærens lysstyrke og brug af mikroskopfiltre og kameradynamik) og de omgivende forhold (f.eks. baggrundsbelysning), og fundet, at disse kan påvirke DNA-vandringen (43) (44) (45) (46).

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Hvert laboratorium bør dokumentere sin eksperimentelle kompetence vedrørende kometassayet ved at demonstrere sin evne til at opnå enkeltcelle- eller enkeltkernesuspensioner af tilstrækkelig høj kvalitet for alle typer målvæv fra de anvendte arter. Kvaliteten af præparaterne vil først blive evalueret med den procentvise DNA-intensitet i komethalen for bærestofbehandlede dyr, der falder inden for et reproducerbart lavt interval. De aktuelle data tyder på, at gruppens gennemsnitlige procentvise DNA-intensitet i komethalen (baseret på middelværdien af medianerne — se punkt 57 for at få yderligere oplysninger om disse betegnelser) i rotteleveren helst ikke må overstige 6 %, hvilket vil være i overensstemmelse med værdierne i JaCVAM-valideringsforsøget (12) og i andre

▼M7

offentliggjorte og proprietære data. Der findes i øjeblikket ikke tilstrækkelige data til at fremsætte anbefalinger om optimale eller acceptable intervaller for andre vævstyper. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre vævstyper, hvis dette er velbegrundet. Testrapporten bør indeholde en relevant gennemgang af resultaterne for kometassayet i disse vævstyper i forhold til den offentliggjorte litteratur eller proprietære data. For det første et det ønskeligt med et lavt interval for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for at sikre et tilstrækkeligt dynamisk interval til at kunne påvise en positiv effekt. For det andet bør hvert laboratorium være i stand til at reproducere den forventede respons for direkte mutagener og pro-mutagener med forskellig virkemåde som angivet i tabel 1 (punkt 29).

Positive stoffer kan vælges, f.eks. fra JaCVAM-valideringsforsøget (12) eller andre offentliggjorte data (se punkt 9), hvis det er relevant, idet disse begrundes, og idet man påviser tydelige positive responser i vævet af interesse. Evnen til at detektere svage virkninger af kendte mutagener, f.eks. EMS, ved lave doser bør også påvises, f.eks. ved at fastlægge forhold mellem dosis og respons med et passende antal doser og en passende afstand mellem disse. De første bestræbelser bør være fokuseret på at opbygge færdigheder med de hyppigst anvendte væv, f.eks. gnaverlever, hvor det er muligt at foretage sammenligninger med eksisterende data og forventede resultater (12). Data for andre vævstyper f.eks. mave/duodenum/jejunum, blod osv. kan indsamles samtidig. Laboratoriet bør kunne dokumentere færdigheder med hver enkelt vævstype fra hver af de arter, man planlægger at undersøge, og bør kunne påvise, at det er muligt at opnå en acceptabel positiv respons med en kendt mutagen (f.eks. EMS) i det pågældende væv.

Der bør indsamles data fra bærestofkontroller/negative kontroller for at påvise, at den negative datarespons kan reproduceres, og for at sikre, at de tekniske aspekter af assayet er behørigt kontrolleret, eller for at indikere behovet for at genskabe historiske kontrolintervaller (se punkt 22).

Det skal bemærkes, at selv om flere typer væv kan indsamles ved obduktion og forarbejdes til kometanalyse, skal laboratoriet have ekspertise i at høste flere vævstyper fra samme dyr, hvorved man kan sikre, at enhver potentiel DNA-læsion ikke går tabt, og at kometanalysen ikke forstyrres. Tidsrummet fra aflivning til fjernelse af væv til forarbejdning kan være kritisk (se punkt 44).

Der skal tages hensyn til dyrevelfærden, mens man udvikler færdighederne i denne test, og derfor kan væv fra dyr, der er anvendt i andre test, bruges til at udvikle kompetence i de forskellige aspekter af testen. Desuden er det muligvis ikke nødvendigt at gennemføre en fuldstændig undersøgelse i de faser, hvor en ny forsøgsmetode skal etableres i et laboratorium, og der kan anvendes færre dyr eller testkoncentrationer ved udvikling af de nødvendige færdigheder.

Historiske kontroldata

I løbet af undersøgelserne af kompetencerne bør laboratoriet opbygge en historisk database for at fastlægge positive og negative kontrolintervaller og fordelinger for relevante typer væv og arter. Anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (47). Forskellige typer væv og forskellige arter samt forskellige bærestoffer og indgivelsesveje kan give forskellige værdier for den procentvise DNA-intensitet i halen ved negativ kontrol. Derfor er det vigtigt at fastlægge negative kontrolintervaller for hvert enkelt vævstype og art. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (48)) til at identificere, hvor variable deres kontroldata er, og for at

▼M7

vise, at metodologien er »under kontrol« i deres laboratorium. Det kan også være nødvendigt at udvælge egnede positive kontrolstoffer, dosisintervaller og forsøgsbetingelser (f.eks. elektroforesebetingelser) for at optimere påvisningen af svage virkninger (jf. punkt 17).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der anvendes normalt almindelige laboratoriestammer af sunde, unge voksne gnavere (6-10 uger ved behandlingsstart, selv om lidt ældre dyr også er acceptable). Valget af gnaverart bør baseres på i) arter, der anvendes i andre toksicitetsundersøgelser (så man kan korrelere data og opnå mulighed for integrerede undersøgelser), ii) arter, der har udviklet tumorer i et karcinogenicitetsforsøg (ved undersøgelse af mekanismen for carcinogenese), eller iii) arter med den mest relevante metabolisme for mennesker, hvis denne er kendt. Der benyttes rutinemæssigt rotter i denne test. Andre arter kan imidlertid også bruges, hvis dette er etisk og videnskabeligt begrundet.

Miljø og fodringsbetingelser

For gnavere bør temperaturen i forsøgslokalet ideelt være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal ideelt set være 50-60 %, men mindst 30 % og helst ikke over 70 %, bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til drikkevand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør anbringes i små grupper (normalt højst fem) af samme køn, hvis der ikke forventes aggressiv adfærd. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet. Faste gulve bør så vidt muligt anvendes, eftersom trådnet kan forårsage alvorlige skader (49). Der skal sørges for hensigtsmæssig miljøberigelse.

Klargøring af dyrene

Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol- og behandlingsgrupper. Dyrene identificeres entydigt og vænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage inden behandlingsstart. Den mindst invasive metode til entydig identifikation af dyrene skal anvendes. Egnede metoder omfatter ringmærkning, tagging, mikrochip og biometrisk identifikation. Tå- og øreklipning er ikke videnskabeligt begrundet i disse test. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 %.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber (50) (51).

Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

▼M7

Testbetingelser

Bærestof

Bærestoffet må ikke frembringe toksiske virkninger ved de anvendte dosismængder og må ikke mistænkes for at indgå i kemisk reaktion med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre bærestoffer end velkendte bærestoffer, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet for så vidt angår forsøgsdyrene, indgivelsesvej og endepunkt. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Det skal bemærkes, at nogle bærestoffer (især tyktflydende bærestoffer) kan fremkalde betændelse og øge baggrundsværdierne af DNA-strengbrud på kontaktstedet, især med flere indgifter.

Kontroller

Positive kontroller

På dette tidspunkt bør en gruppe på mindst tre analyserbare dyr af samme køn eller af begge køn, hvis begge køn anvendes (se punkt 32), som er behandlet med et positivt kontrolstof, normalt medtages i alle test. I fremtiden vil det måske være muligt at påvise tilstrækkelig kompetence, således at man kan mindske behovet for positive kontroller. Hvis der anvendes flere prøveudtagningstidspunkter (f.eks. med en enkelt indgivelsesprotokol), er det kun nødvendigt at medtage positive kontroller på et af prøveudtagningstidspunkterne, men det bør sikres, at udformningen er afbalanceret (se punkt 48). Det er ikke nødvendigt at indgive sideløbende positive kontrolstoffer ad samme vej som testkemikaliet, selv om det er vigtigt at benytte samme vej ved måling af virkninger på kontaktstedet. Det bør påvises, at de positive kontrolstoffer medfører brud på DNA-strengen i alle typer væv af interesse for testkemikaliet, og EMS vil sandsynligvis være det oplagte positive kontrolstof, eftersom det har forårsaget brud på DNA-strengen i alle vævstyper, som er blevet undersøgt. Doserne af de positive kontrolstoffer bør vælges, så de frembringer moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets ydeevne og følsomhed, og kan baseres på dosis/respons-kurver, som laboratoriet har udarbejdet under demonstrationen af kompetence. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen hos sideløbende positive kontroldyr bør være i overensstemmelse med laboratoriets forudfastlagte interval for de enkelte vævstyper og prøveudtagningstidspunkter for den pågældende art (se punkt 16). Eksempler på positive kontrolstoffer og nogle af deres målvæv (hos gnavere) findes i tabel 1. Andre stoffer end dem, der er angivet i tabel 1, kan vælges, hvis det er videnskabeligt begrundet.

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolstoffer og deres målvæv

Stoffer og CASRN
Ethylmethansulfonat (CASRN 62-50-0) for alle vævstyper
Ethylnitrosourinstof (CASRN 759-73-9) for lever og mavesæk, duodenum eller jejunum
Methylmethansulfonat (CASRN 66-27-3) for lever, mavesæk, duodenum eller jejunum, celler fra udskylningsvæsker fra lunger eller bronchoalveolærer, nyre, blære, lunger, testis og knoglemarv/blod
N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidin (CASRN 70-25-7) for mavesæk, duodenum eller jejunum
1,2-dimethylhydrazin 2HCl CASRN 306-37-6) for lever og tarm
N-methyl-N-nitrosourinstof (CASRN 684-93-5) for lever, knoglemarv, blod, nyre, mave, jejunum og hjerne.

▼M7

Negative kontroller

En gruppe af negative kontroldyr, som kun er behandlet med bærestof, og som ellers er behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, bør indgå i alle test for alle prøveudtagningstidspunkter og alle vævstyper. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen hos negative kontroldyr bør ligge inden for den foruddefinerede baggrundskoncentration for laboratoriet for hver enkelt vævstype og prøveudtagningstidspunkt for den pågældende art (se punkt 16). Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte bærestof, antallet af indgifter eller indgivelsesvejen ikke medfører skadelige eller genotoksiske virkninger, bør der gennemføres indledende undersøgelser, inden den fulde undersøgelse gennemføres med henblik på at fastslå, at bærestofkontrollen er acceptabel.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Selv om der findes kun få data for hundyr, som gør det muligt at foretage sammenligninger mellem kønnene med hensyn til kometassayet, er andre in vivo-genotoksiske responser sammenlignelige for han- og hundyr, og derfor kan de fleste undersøgelser udføres på begge køn. Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f.eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed osv., herunder i en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start (og under fastlæggelsen af kompetence) bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe (færre i den sideløbende kontrolgruppe, jf. punkt 29). Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse, der udføres i henhold til de i punkt 33 fastlagte parametre med tre dosisgrupper og en sideløbende negativ og positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn), typisk højst kræve 33-25 dyr.

BEHANDLINGSPLAN

Dyrene bør gives daglige behandlinger over en periode på to dage eller derover (dvs. to eller flere behandlinger med ca. 24 timers mellemrum), og prøverne bør indsamles en gang 2-6 timer (eller ved T_{max}) efter sidste behandling (12). Prøver fra længerevarende indgivelsesplaner (f.eks. 28 dages daglig dosering) er acceptable. Der findes dokumentation for en vellykket kombination af komet- og erythrocyt-mikrokernetesten (10) (19). Dog bør man nøje overveje logistikken i forbindelse med vævsprøver til kometanalyse sammen med kravene til vævsprøver til andre typer af toksikologiske vurderinger. I det fleste tilfælde er det ikke hensigtsmæssigt at høste 24 timer efter den sidste dosis, hvilket er typisk for en generel undersøgelse af toksicitet (se afsnit 40 om prøveudtagningstidspunkt). Brug af andre behandlings- og prøveudtagningsplaner bør begrundes (se tillæg 3). Eksempelvis kan en enkelt behandling med flere prøver anvendes, men det skal imidlertid bemærkes, at det er nødvendigt med flere dyr til en undersøgelse med en enkelt indgift på grund af behovet for flere prøveudtagningstidspunkter, men i visse tilfælde kan det være at foretrække, f.eks. når testkemikaliet inducerer overdreven toksicitet efter gentagen indgivelse.

▼M7

Uanset hvordan testen udføres, er det acceptabelt, så længe testkemikaliet giver en positiv respons, eller, for en negativ undersøgelse, så længe eksponering af eller toksicitet over for målvævet påvises direkte eller indirekte, eller hvis grænsedosis opnås (se punkt 36).

Testkemikalier kan også indgives som to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større volumen. Under disse omstændigheder bør prøveudtagningstidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den sidste dosering (se punkt 40).

Dosisstørrelse

Hvis der gennemføres en indledende forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data fra andre relevante undersøgelser, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen i henhold til de gældende fremgangsmåder for gennemførelse af undersøgelser af dosisinterval. Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højeste tolererede dosis (MTD) defineret som den dosis, der medfører lette toksiske virkninger i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. tydelige kliniske signaler såsom unormal adfærd eller unormale reaktioner, fald i kropsvægt eller cytotoksicitet i målvævet), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning. For et ikke-giftigt testkemikalie med en indgivelsesperiode på 14 dage eller mere er den maksimale (grænse-) dosis 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. For indgivelsesperioder på mindre end 14 dage er den maksimale (grænse-) dosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse bestemmelser variere.

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, der kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang indgivelsesperiode, kan være undtaget fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For både akutte og subakutte versioner af kometassayet bør man ud over den maksimale dosis (MTD, størst mulige dosis, maksimal eksponering eller grænsedosis) vælge en aftagende rækkefølge af mindst to yderligere dosisniveauer med en hensigtsmæssig spredning (helst adskilt af mindre end 10) for hvert prøveudtagningstidspunkt med henblik på at påvise dosisrelaterede responser. De anvendte dosisniveauer bør imidlertid også helst dække et interval fra det maksimale til et niveau, der medfører lav eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) ved alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser (jf. punkt 54-55). Undersøgelser, hvor man ønsker at foretage en grundigere undersøgelse af dosis/respons-kurven, kan kræve en eller flere yderligere dosisgrupper.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand,

▼M7

topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke, da det typisk ikke er en relevant eksponeringsvej for mennesker, og den bør kun anvendes med særlig begrundelse (f.eks. visse positive kontrolstoffer, til undersøgelsesformål eller til visse lægemidler, der administreres ad intraperitoneal vej). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Brug af større mængder end dette (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Så vidt muligt bør de forskellige dosisniveauer opnås ved at justere koncentrationen af doseringsformuleringen for at sikre et konstant volumen i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Prøveudtagningstidspunkt

Prøveudtagningstidspunktet er en kritisk variabel, fordi det bestemmes af den periode, der er nødvendig for, at testkemikalierne kan opnå maksimal koncentration i målvævet og for at frembringe DNA-strengbrud, men inden disse brud fjernes, udbedres eller fører til celledød. Persistensen af nogle af de læsioner, som fører til DNA-strengbrud, som registreres af kometassayet, kan være meget kort, i det mindste for visse kemikalier, som testes in vitro (52) (53). Hvis der er mistanke om sådanne forbigående DNA-skader, bør der træffes foranstaltninger med henblik på at begrænse tabene ved at sikre, at væv udtages tilstrækkeligt tidligt, evt. tidligere end de nedenfor angivne standardtidspunkter. De(t) optimale prøveudtagningstidspunkt(er) kan være kemikalie- eller rutespecifikt, f.eks. hurtig vævseksponering med intravenøs indgivelse eller eksponering ved indånding. Dette betyder, at når det er muligt, bør prøveudtagningstidspunkterne fastlægges ud fra kinetiske data (f.eks. (T_{max}), hvor den maksimale plasma- eller vævskoncentration (C_{max}) opnås, eller ved den stabile tilstand ved flere indgifter). I mangel af kinetiske data vil det være et egnet kompromis til måling af genotoksicitet at udtage prøver 2-6 timer efter den sidste behandling ved to eller flere behandlinger eller både 2-6 og 16-26 timer efter en enkelt indgift, selv om det er vigtigt at obducere alle dyr på samme tidspunkt efter den sidste (eller eneste) dosis. Oplysninger om forekomsten af toksiske virkninger i målorganer (hvis disse findes) kan også bruges til at vælge hensigtsmæssige prøveudtagningstidspunkter.

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer vedrørende dyrenes helbred, og de bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper (54). Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og dødelighed. Ved undersøgelser af længere varighed bør alle dyr vejes mindst en gang om ugen og ved afslutningen af testperioden. Fødeindtaget måles ved hver kostændring og mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb og anvendes generelt ikke til kometanalyse.

Opsamling af væv

Eftersom det er muligt at undersøge induktion af DNA-strengbrud (kometer) i næsten alle væv, bør begrundelsen for valg af det indsamlede væv være klart defineret og baseret på begrundelsen for, at man foretager undersøgelsen i kombination med evt. eksisterende ADME-, genotoksicitets-, karcinogenicitet- eller andre toksicitetsdata for det undersøgte testkemikalie. Vigtige faktorer, der bør

▼M7

indgå i overvejelserne, er indgivelsesmåde (baseret på sandsynlige humane eksponeringsveje), den forventede vævsdistribution og -absorption, metabolismens rolle og testkemikaliernes mulige handlingsmekanisme. Leveren er det væv, der undersøges oftest, og for hvilken der findes flest data. I mangel af baggrundsinformation, og hvis der ikke identificeres nogen specifikke vævstyper af interesse, kan det begrundes at foretage udtagning af leverprøver, eftersom den er en primær lokalitet for xenobiotisk metabolisme og ofte er stærkt udsat for såvel moderstof(fer) som metabolit(ter). I nogle tilfælde kan undersøgelse af det direkte kontaktsted (f.eks. ved oralt indgivne kemikalier proventriculus eller duodenum/jejunum, eller ved indånding af kemikalier lungerne) være særdeles relevant. De supplerende eller alternative vævstyper bør udvælges på grundlag af de konkrete årsager til, at testen gennemføres, men det kan være nyttigt at undersøge flere vævstyper fra de samme dyr, hvis laboratoriet har dokumenteret kompetence med disse vævstyper og med at håndtere flere vævstyper på samme tid.

Fremstilling af prøver

For de processer, der er beskrevet i de følgende afsnit (nr. 44-49), er det vigtigt, at alle opløsninger eller stabile suspensioner anvendes inden udløbsdatoen, eller at de fremstilles lige inden testen, når dette er nødvendigt. Også i de følgende afsnit betragtes den tid, der bruges på at i) fjerne hver vævstype efter obduktion, ii) behandle hver vævstype med henblik på celle-/kernesuspensioner og iii) behandle suspensionen og præparere objektglassene, som kritiske variabler (se definitioner, tillæg 1), og den acceptable varighed af hver af disse faser bør fastlægges under definition af metoden og påvisning af kompetencer.

Dyrene aflives i overensstemmelse med gældende lovgivning om dyrevelfærd og 3R-princippet på de(t) relevante tidspunkt(er) efter sidste behandling med et testkemikalie. De(t) udvalgte væv fjernes og dissekeres, og en del indsamles til kometassayet, samtidig med at en del af vævet opskæres og anbringes i formaldehydopløsning eller et passende fiksativ til mulig histopatologisk analyse (se punkt 55) i henhold til standardmetoderne (12). Vævet til kometassayet anbringes i hakningsbufferen, skylles tilstrækkeligt med koldt hakningsbuffer for at fjerne resterende blod og opbevares i en iskold hakningsbuffer, indtil det skal bruges. In situ-perfusion kan også udføres, f.eks. for lever og nyre.

Der findes mange offentliggjorte metoder til celle-/kerneisolation. Disse omfatter hakning af væv som f.eks. lever og nyre, skrabning af slimhindeoverflader for mave-tarmkanalen, homogenisering og enzymisk fordøjelse. Ved JaCVAM-valideringstesten undersøgte man kun isolerede celler, og med henblik på etablering af metoden og for at være i stand til at henvise til JaCVAM-forsøgsdataene med hensyn til dokumentation af kompetence foretrækkes isolerede celler. Det er dog blevet påvist, at der ikke var nogen væsentlig forskel i assayresultaterne, uanset om man anvendte isolerede celler eller kerner (8). Forskellige metoder til isolering af celler/kerner (f.eks. homogenisering, hakning, enzymisk fordøjelse og filtrering) gav ligeledes sammenlignelige resultater (55). Derfor kan enten isolerede celler eller isolerede kerner anvendes. Et laboratorium bør foretage en grundig vurdering og validering af vævsspecifikke metoder til isolation af enkeltceller/-kerner. Som diskuteret i punkt 40 kan persistensen af nogle af de læsioner, som betyder, at DNA-strengbrud kan registreres med kometassayet, være meget kort (52) (53). Derfor er det, uanset hvilken metode der anvendes til at fremstille suspensioner med en celle/kerne, vigtigt, at vævene behandles så hurtigt som muligt, efter at dyrene er aflivet, og opbevares under forhold, der reducerer fjernelse af læsioner (f.eks. ved at opbevare vævet ved lav temperatur). Cellesuspensioner bør opbevares iskoldt, indtil de er klar til brug, så man kan påvise minimal variation mellem prøverne samt relevante positive og negative kontrolresponser.

▼M7

PRÆPARERING AF OBJEKTGLAS

Præparering af objektglas bør ske så hurtigt som muligt (helst inden for en time) efter præparering af enkeltcellen/-kernen, men temperaturen og tidsrummet mellem dyrets død og præparering af objektglasset skal kontrolleres nøje og valideres i henhold til laboratoriets bestemmelser. Mængden af cellesuspension, der tilsættes agarose med lavt smeltepunkt (normalt 0,5-1,0 %) for at præparere objektglassene, må ikke sænke den procentvise andel af agarose med lavt smeltepunkt til under 0,45 %. Den optimale celletæthed bestemmes ved hjælp af billedanalysesystemet, der anvendes til scoring af kometer.

Lysis

Lysisbetingelserne er også en kritisk variabel og kan påvirke de strengbrud, der skyldes særlige typer DNA-ændringer (visse DNA-alkyleringer og baseaddukter). Det anbefales derfor, at lysisbetingelser holdes så konstante som muligt for alle objektglas i et eksperiment. Når objektglassene er præpareret, nedsænkes de i den afkølede lysisopløsning i mindst en time (eller natten over) ved omkring 2-8 °C i dæmpet belysning, f.eks. gult lys (eller lystæt), så de ikke udsættes for hvidt lys, der kan indeholde UV-komponenter. Efter denne inkubationsperiode skylles objektglassene for at fjerne tilbageværende rengøringsmiddel og salte inden baseudfoldningstrinnet. Dette kan gøres med renset vand, neutraliseringsbuffer eller fosfatbuffer. Elektroforesebuffer kan også anvendes. Dette vil opretholde det basiske miljø i elektroforesekammeret.

Udfoldning og elektroforese

Objektglassene placeres tilfældigt på platformen i en ubåds-lignende elektroforeseenhed, der indeholder tilstrækkeligt meget elektroforeseopløsning til, at objektglassenes overflade er fuldstændig dækket (dækningens dybde skal også være den samme fra kørsel til kørsel). I en anden type elektroforeseenheder til kometassays, dvs. enheder med aktiv køling, cirkulation og strømforsyning med høj kapacitet, vil en større dækning med opløsningen føre til en større strømstyrke ved konstant spænding. Objektglassene bør anbringes på en afbalanceret måde i elektroforesebeholderen for at afbøde virkningerne af eventuelle hældninger eller kanter i beholderen og for at minimere variationen fra batch til batch, dvs. at der ved hver elektroforesekørsel bør være det samme antal objektglas fra hvert enkelt dyr i undersøgelsen og prøver fra de forskellige doseringsgrupper samt negative og positive kontroller. Objektglassene skal stå i mindst 20 minutter, så DNA'et kan foldes ud, og udsættes derefter for elektroforese under kontrollerede forhold, som vil øge assayets følsomhed og dynamiske område (dvs. føre til acceptable niveauer for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for negative og positive kontroller, hvilket maksimerer følsomheden). Graden af DNA-migration er lineært forbundet med varigheden af elektroforesen og ligeledes med styrken (V/cm). Baseret på JaCVAM-forsøget kan dette være 0,7 V/cm i mindst 20 minutter. Varigheden af elektroforesen anses for at være en kritisk variabel, og elektroforesetiden bør fastsættes med henblik på at optimere det dynamiske område. Længere elektroforesetider (f.eks. 30 eller 40 minutter for at maksimere følsomheden) fører til stærkere positive responser med kendte mutagener. Men længere elektroforesetider kan dog også føre til uforholdsmæssig stor vandring i kontrolprøverne. Ved hvert forsøg bør spændingen holdes konstant, og variationen af de øvrige parametre bør ligge inden for et snævert og specificeret område, f.eks. ved JaCVAM-forsøget, hvor der ved 0,7 V/cm frembringes en startstrømstyrke på 300 mA. Bufferdybden bør tilpasses med henblik på at opnå de nødvendige betingelser og bør opretholdes gennem hele forsøget. Strømstyrken ved elektroforeseperiodens start og slutning registreres. De optimale betingelser bør derfor fastsættes ved den første demonstration af kompetence i det pågældende laboratorium med hver at de undersøgte vævstyper. Temperaturen i elektroforeseopløsningen i løbet af udfoldning og elektroforese bør holdes

▼M7

på et lavt niveau, normalt 2-10 °C (10). Temperaturen i elektroforeseopløsningen registreres, når udfoldningen begynder, ved starten og ved slutningen af elektroforesen.

Efter endt elektroforese nedsænkes/skylles objektglassene i/med neutraliseringsbufferen i mindst 5 minutter. Geler kan farves og scores »friske« (f.eks. inden for 1-2 dage) eller kan dehydreres med henblik på senere scoring (f.eks. inden for 1-2 uger efter farvning) (56). Betingelserne bør imidlertid valideres under demonstrationen af kompetencer, og historiske oplysninger bør fremskaffes og opbevares separat for hver af disse betingelser. I sidstnævnte tilfælde bør objektglassene dehydreres ved nedsænkning i absolut ethanol i mindst 5 minutter, lufttørres og herefter opbevares enten ved stuetemperatur eller i en beholder i køleskab indtil scoringen.

Målemetoder

Kometer bør scores kvantitativt ved hjælp af et automatisk eller halvautomatisk billedanalysesystem. Objektglassene farves med en passende fluorescerende farve, f.eks. SYBR Gold, Green I, propidiumiodid eller ethidiumbromid, og måles ved en passende forstørrelse (f.eks. 200x) med et mikroskop, der er udstyret med epi-fluorescens og hensigtsmæssige detektorer eller et digitalkamera (f.eks. CCD).

Celler kan inddeles i tre kategorier, som beskrevet i atlasset over kometbilleder (57), nemlig egnede til bedømmelse, ikke egnede til bedømmelse og »pindsvin« (se afsnit 56 for en yderligere diskussion). Kun celler, der er egnede til bedømmelse (klart defineret hoved og hale uden interferens med tilstødende celler), bør scores for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for at undgå artefakter. Det er ikke nødvendigt at rapportere hyppigheden af celler, der ikke er egnede til scoring. Hyppigheden af pindsvin bestemmes på grundlag af den visuelle scoring (eftersom mangel på et klart defineret hoved betyder, at de ikke umiddelbart kan ses ved billedanalyse) i mindst 150 celler pr. prøve (se punkt 56 for yderligere diskussion) og dokumenteres særskilt.

Alle objektglas til analyser, herunder fra positive og negative kontroller, bør kodes selvstændigt og scores »blindt«, så bedømmeren ikke er bekendt med eksponeringsbetingelserne. For hver prøve (pr. vævstype pr. dyr) bør mindst 150 celler (ekskl. pindsvin — se punkt 56) analyseres. Scoring af 150 celler pr. dyr for mindst fem dyr pr. dosis (mindre ved den sideløbende positive kontrol — se punkt 29) sikrer tilstrækkelig statistisk power i henhold til analysen i Smith et al., 2008 (5). Hvis der anvendes objektglas, kan dette ske fra to eller tre scorede objektglas pr. prøve, når der anvendes fem dyr pr. gruppe. Flere områder af objektglasset bør observeres ved en tæthed, der sikrer, at der ikke forekommer overlapning af halerne. Det bør undgås at foretage scoring ved kanten af objektglassene.

DNA-strengbrud i kometassayet kan måles ved hjælp af uafhængige endepunkter såsom den procentvise DNA-intensitet i komethalen, halelængde og halemoment. Alle tre målinger kan foretages, hvis man anvender hensigtsmæssige softwaresystemer til billedanalyse. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen (også kaldet procentvis haleintensitet) anbefales dog til evaluering og fortolkning af resultater (12) (40) (41) (42) og bestemmes af intensiteten af DNA-fragmenter i halen udtrykt som en procentdel af cellens samlede intensitet (13).

▼M7

Vævsbeskadigelse og cytotoksicitet

Positive resultater i kometassayet skyldes muligvis ikke udelukkende genotoksicitet, idet toksicitet i målvævet også kan føre til stigninger i DNA-vandringen (12) (41). Omvendt kan der ofte observeres lav eller moderat cytotoksicitet med kendte genotoksiner (12), hvilket viser, at det ikke er muligt at skelne mellem DNA-migration forårsaget af genotoksicitet og cytotoksicitet, der udelukkende forekommer i kometassayet. Når der imidlertid observeres stigninger i DNA-migrationen, anbefales det, at en eller flere indikatorer for cytotoksicitet undersøges, eftersom dette kan bidrage til fortolkningen af resultaterne. Stigninger i DNA-migration samtidig med tilstedeværelsen af klare beviser for cytotoksicitet bør fortolkes med forsigtighed.

Der har været foreslået mange målinger af cytotoxicitet, og histopatologiske forandringer anses for en relevant måling af vævstoksicitet. Observationer såsom inflammation, celleinfiltration og apoptotiske eller nekrotiske forandringer er blevet associeret med øget DNA-migration, men som påvist i JaCVAM-valideringstesten (12) findes der ikke en endelig liste over histopatologiske forandringer, som altid er forbundet med øget DNA-migration. Ændrede foranstaltninger inden for klinisk kemi (f.eks. AST, ALT) kan også give nyttige oplysninger om vævsskader, og man kan også overveje supplerende indikatorer såsom caspaseaktivering, TUNNEL-farvning, Annexin V-farvning osv. Der findes dog kun begrænsede offentliggjorte data, som har været anvendt til in vivo-undersøgelser, og nogle kan være mindre pålidelige end andre.

Pindsvin (eller skyer, spøgelsesceller) er celler, der udviser et mikroskopbillede, der består af et lille eller ikke-eksisterende hoved og store, diffuse haler, og anses for at være stærkt beskadigede celler, selv om pindsvinenes ætiologi er usikker (se tillæg 3). På grund af deres udseende er målinger af den procentvise DNA-intensitet i komethalen ved billedanalyse upålidelige, og derfor bør pindsvin vurderes separat. Forekomsten af pindsvin noteres og rapporteres, og enhver relevant stigning, der menes at skyldes testkemikaliet, bør undersøges og fortolkes med forsigtighed. Kendskab til testkemikaliernes potentielle virkemåde kan hjælpe med ved sådanne overvejelser.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Dyret er forsøgsenheden, og derfor bør både data for de enkelte dyr og de opsummerede resultater præsenteres i tabelform. På grund af den hierarkiske datastruktur anbefales det at bestemme middelværdien af den procentvise DNA-intensitet i komethalen for hvert objektglas og beregne gennemsnittet af middelværdierne for hvert dyr (12). Gennemsnittet af middelværdierne for de enkelte dyr bestemmes derefter for at opnå et gennemsnit for gruppen. Alle disse værdier bør medtages i rapporten. Alternative metoder (jf. punkt 53) kan anvendes, hvis dette er videnskabeligt og statistisk begrundet. Der kan foretages en statistisk analyse ved hjælp af forskellige metoder (58) (59) (60) (61). Ved valget af de statistiske metoder bør der tages hensyn til behovet for at transformere dataene (f.eks. logaritme eller kvadratrod) og/eller for at tilføje et mindre tal (f.eks. 0,001) til alle (selv ikke-nul-) værdier for at mindske effekten af nul-celleværdier, jf. diskussionen i ovennævnte referencer. Nærmere oplysninger om analyse af forholdet mellem behandling og køn, når begge køn anvendes, og efterfølgende analyse af data, hvor der enten konstateres eller ikke konstateres forskelle, findes i tillæg 2. Data om toksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

a. Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontroldatabase som beskrevet i punkt 16.

▼M7

b. Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 29) bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

c. Et tilstrækkeligt antal celler og doser er blevet analyseret (punkt 52 og 36-38).

d. Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 36.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

a. mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

b. stigningen er dosisafhængig, når den evalueres med en passende trend test

c. et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata for bestemte arter, bærestoffer, indgivelsesveje, væv og antal indgifter.

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliet for at kunne fremkalde strengbrud på DNA i de vævstyper, der undersøges i dette testsystem. Hvis kun et eller to af disse kriterier er opfyldt, se da afsnit 62.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

a. ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

b. der ikke indtræder en koncentrationsafhængig stigning ved evaluering med en passende trend test

c. alle resultater ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata for bestemte arter, bærestoffer, ruter, væv og antal indgifter

d. der er påvist direkte eller indirekte evidens, som støtter eksponering af eller toksicitet over for målvævet.

Testkemikaliet anses i så fald for ikke at kunne fremkalde strengbrud på DNA i de vævstyper, der undersøges i dette testsystem.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv (dvs. at ikke alle kriterier i punkt 59 eller 60 er opfyldt) og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser, hvis det er videnskabeligt begrundet. Det kan være nyttigt at score flere celler eller foretage en ny undersøgelse, evt. med optimerede forsøgsbetingelser (f.eks. dosisintervaller, andre indgivelsesveje, andre prøveudtagningstidspunkter eller andet væv).

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at resultaterne er tvetydige.

▼M7

For at vurdere den biologiske relevans af et positivt eller tvetydigt resultat er der behov for oplysninger om cytotoksicitet i målvævet (jf. punkt 54-55). I tilfælde af at der alene forekommer positive eller usikre resultater, hvis der er klar evidens for cytotoksicitet, vil man konkludere, at undersøgelsen er tvetydig for genotoksicitet, medmindre der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at underbygge en endelig konklusion. I tilfælde af et negativt undersøgelsesresultat, hvor der er tegn på toksicitet ved alle testede doser, kan det være tilrådeligt at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— kilde, evt. partinummer

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis denne er kendt.

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

— fremstilling af dosisformuleringer

— analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominel koncentration).

Forsøgsdyr:

— anvendte arter/stammer samt videnskabelige og etiske begrundelser for valget

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljø, føde, berigelse osv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens start og afslutning, samt interval for legemsvægt samt middel- og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontroldata

▼M7

— resultater fra (en eventuel) undersøgelse til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om præparering af testkemikaliet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— begrundelse for indgivelsesvej

— injektionssted (for subkutane og intravenøse undersøgelser)

— metoder til fremstilling af prøver, om muligt histopatologiske analyser, især for et kemikalie med positiv komet-respons

— begrundelse for valg af væv

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet om der er opnået negative resultater

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i føde/drikkevand (ppm) og fødeoptagelse, hvis dette er relevant

— oplysninger om kvalitet af føde og vand

— detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg (f.eks. eventuelle toksikokinetiske data)

— metode til smertelindring, analgesi

— aflivningsmetode

— procedurer for isolering og opbevaring af væv

— metoder til fremstilling af enkeltcelle-/enkeltkernesuspension

— kilde og partinummer for alle reagenser (når det er muligt)

— metoder til evaluering af cytotoksicitet

— elektroforese

— anvendte farvningsteknikker

— metoder til scoring og måling af kometer.

Resultater:

— eventuelle almindelige kliniske observationer, før og i løbet af testperioden for hvert dyr

— dokumentation for cytotoksicitet, hvis det er relevant

▼M7

— for undersøgelser af længere end en uges varighed: dyrenes individuelle vægt i løbet af undersøgelsen, herunder interval for kropsvægt, middel- og standardafvigelse for hver gruppe samt fødeindtag

— dosis/respons-forhold, hvor det kan beregnes

— for hver vævstype/hvert dyr, den procentvise DNA-intensitet i komethalen (eller andre målinger, hvis dette vælges) og middelværdier pr. objektglas, gennemsnitsværdier pr. dyr og middelværdier pr. gruppe

— sideløbende og historiske negative kontroldata med intervaller, medianer/gennemsnit og standardafvigelser for hver evalueret vævstype

— data fra sideløbende negative og positive kontrolprøver

— for andet væv end lever, en dosis/respons-kurve, hvortil den positive kontrol anvendes. Dette kan være fra data, der er indsamlet i forbindelse med godtgørelse af kompetence (jf. punkt 16-17) og bør ledsages af en begrundelse med henvisninger til aktuel litteratur for at fastslå hensigtsmæssigheden af størrelsen og spredningen af responserne på kontrollerne i dette væv

— anvendte statistiske analyser og metoder samt kriterier for, hvornår en respons kan anses som positiv, negativ eller tvetydig

— hyppigheden af pindsvin i hver gruppe og pr. dyr.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

Referencer

LITTERATUR

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

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

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, nr. 195 og 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the »Comet« assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

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

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

(49) Bilag A til den europæiske konvention om beskyttelse af hvirveldyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål (ETS nr. 123)

(50) Kapitel B.8 til dette bilag: *Subakut toksicitet (inhalation): 28-dages undersøgelse*.

(51) Kapitel B.29 til dette bilag: *Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages undersøgelse*.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), »Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Alkalisk encellet gelelektroforese: Følsom metode til påvisning af primær DNA-skade på celle-/kerneniveau.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Komet: Den form, som nukleoider får efter at været udsat for et elektroforetisk felt, på grund af ligheden med kometer: hovedet er kernen, og halen udgøres af DNA'et, der migrerer ud af kernen i det elektriske felt.

En kritisk variabel/parameter: En protokolvariabel, hvor en lille ændring kan få stor indvirkning på assayets konklusion. Kritiske variabler kan være vævsspecifikke. Kritiske variabler bør ikke ændres, især ikke under en test, uden at der er taget hensyn til, hvordan ændringen vil ændre en assayresponsen, f.eks. som angivet af størrelsen og variationen i positive og negative kontroller. Testrapporten bør indeholde en opgørelse over ændringer af kritiske variabler, der er foretaget under testen eller sammenholdt med standardprotokollen for laboratoriet, samt en begrundelse for hver ændring.

Halens intensitet eller den procentvise DNA-intensitet: Dette svarer til komethalens intensitet i forhold til den samlede intensitet (hoved plus hale). Det afspejler mængden af DNA-brud, udtrykt som procentdel.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M7

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-KOMETASSAYET

Faktormodellen og dens analyse

I denne model testes mindst 5 hanner og 5 hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner, plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ([1]). Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også inddeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponserne er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved Design of Experiment-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

([1]) Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

▼**M7**

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

Tillæg 3

BEGRÆNSNINGER I ASSAYET

På grund af det aktuelle videnniveau er der adskillige begrænsninger forbundet med in vivo-kometassayet. Det forventes, at disse begrænsninger vil blive mindre eller mere snævert defineret, da der er gjort flere erfaringer med at anvende assayet til besvarelse af sikkerhedsspørgsmål i lovgivningssammenhæng.

1. Nogle former for DNA-skader kan være kortvarige, dvs. at de muligvis repareres for hurtigt til, at de kan observeres i 24 timer eller mere efter sidste dosis. Der findes ikke nogen påviselig liste over typer af kortvarige skader, heller ikke over de kemikalier, som kan forårsage denne type skader, og det vides heller ikke, over hvilket tidsrum denne type skader kan påvises. Den/de optimale prøveudtagningstidspunkt/-er kan også være kemikalie- eller rutespecifikke, og prøveudtagningstidspunkter bør bestemmes ud fra kinetiske data (f.eks. det tidspunkt, T_{max}, hvor den maksimale plasma- eller vævskoncentration opnås), når sådanne data foreligger. I de fleste af de valideringsundersøgelser, der underbygger denne forsøgsmetode, blev der foretaget obduktion to eller tre timer efter indgivelse af den sidste dosis. I de fleste undersøgelser i litteraturen indgives den sidste dosis mellem 2 og 6 timer før aflivning. Derfor er disse erfaringer brugt som grundlag for anbefalingen i forsøgsmetoden, nemlig at den sidste dosis, hvis der ikke foreligger data, bør indgives på et angivet tidspunkt mellem 2 og 6 timer før obduktion.

2. Der findes ingen kendte data for undersøgelse af testens følsomhed over for påvisning af kortvarige DNA-skader efter indgivelse i foder eller drikkevand sammenlignet med indgivelse med sonde. DNA-skader er konstateret efter indgivelse i foder og drikkevand, men der er relativt få rapporteringer heraf sammenlignet med den langt større erfaring med indgivelse med sonde og intraperitonal indgivelse. Assayets følsomhed kan således mindskes for kemikalier, som fremkalder kortvarige skader, når de indgives i foder eller drikkevand.

3. Der er ikke foretaget laboratorieundersøgelser af andet væv end lever og mave, og der er derfor ingen anbefaling til, hvordan der opnås en følsom og reproducerbar respons i andet væv end lever, såsom forventede positive og negative kontrolintervaller. For lever er der heller ikke opnået enighed om at fastsætte en nedre grænse for den negative kontrolværdi.

4. Selv om det fremgår af flere publikationer, at cytotoksicitet har en forvirrende effekt in vitro, findes der meget få data vedrørende cytotoksicitet in vivo, og det er derfor ikke muligt at anbefale en bestemt måling af cytotoksicitet. Histopatologiske forandringer såsom inflammation, celleinfiltration og apoptotiske eller nekrotiske forandringer er blevet associeret med øget DNA-migration, men som påvist i JaCVAM-valideringstesten (OECD, 2014) resulterer disse ændringer ikke altid i positive kometresultater, og der findes derfor ikke en endelig liste over histopatologiske forandringer, som altid er forbundet med øget DNA-migration. Pindsvin (eller skyer, spøgelsesceller) er tidligere blevet foreslået som en indikator for cytotoksicitet, men ætiologien for disse pindsvin er usikker. Nogle data tyder på, at de kan være forårsaget af kemikalierelateret cytotoksicitet, mekanisk/enzym-induceret skade, der er opstået under fremstillingen af prøven (Guerard *et al.*2014), og/eller en mere ekstrem virkning af testkemikaliets genotoksicitet. Andre data synes at vise, at de skyldes omfattende DNA-skader, som måske kan repareres (Lorenzo *et al.,* 2013).

▼M7

5. Væv eller cellekerner er med held blevet frosset ned med henblik på senere analyse. Dette resulterer normalt i en målelig virkning på responsen på bærestoffet og den positive kontrol (Recio *et al.,* 2010, Recio et al., 2012, Jensen et al., 2013). Hvis der anvendes nedfrysning, bør laboratoriet dokumentere kompetence med hensyn til nedfrysningsmetoder samt bekræfte acceptable lave intervaller i den procentvise DNA-intensitet i halen i målvæv fra dyr behandlet med bærestof, og at der stadig kan påvises positive responser. Litteraturen indeholder eksempler på forskellige metoder til nedfrysning af væv. På nuværende tidspunkt er der ikke enighed om, hvordan væv bedst nedfryses og optøes, og hvordan det vurderes, om en potentielt ændret respons kan påvirke testens følsomhed.

6. Nyere arbejde viser, at listen over kritiske variabler forventes at blive stedse kortere og parametrene for kritiske variabler mere præcist defineret (Guerard *et al.,* 2014).

Referencer

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,** *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼**M8**

B.63. **SCREENINGSTEST FOR REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSTOKSICITET**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 421 (2016). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier bliver revideret regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling. Den oprindelige screeningstestvejledning 421 blev vedtaget i 1995 med udgangspunkt i en protokol for en indledende screeningstest for reproduktionstoksicitet (»Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test«), der blev drøftet på to ekspertmøder i henholdsvis London i 1990 (1) og Tokyo i 1992 (2).

2. Denne forsøgsmetode er blevet opdateret med endepunkter for hormonforstyrrende stoffer som en opfølgning på de højt prioriterede aktiviteter, som OECD indledte i 1998 for at revidere eksisterende testvejledninger og udvikle nye testvejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer (3). OECD TG 407 (undersøgelse af toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) i gnavere, kapitel B.7 i dette bilag) blev f.eks. i 2008 forbedret med parametre, der kan påvise testkemikaliers endokrine virkemåde. Formålet med at opdatere testvejledning 421 var at indlemme endepunkter for hormonforstyrrende stoffer i testvejledningerne om screening, hvor eksponeringsperioderne omfatter følsomme udviklingsmæssige perioder (prænatale eller tidligt postnatale perioder).

3. De valgte supplerende endepunkter for hormonforstyrrende stoffer, som også er at finde i testvejledning 443 (udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation, kapitel B.56 i dette bilag), blev indlemmet i testvejledning 421 på baggrund af en feasibilityundersøgelse, hvor der blev set på de videnskabelige og tekniske spørgsmål i forbindelse med deres indlemmelse samt eventuelle tilpasninger af testens udformning som følge heraf (4).

4. Denne forsøgsmetode er beregnet til at generere begrænsede oplysninger om et testkemikalies virkninger på han- og hundyrs reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel. Den er ikke et alternativ til og erstatter ikke de eksisterende forsøgsmetoder B.31, B.34, B.35 og B.56.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Denne screeningsforsøgsmetode kan anvendes til at indsamle indledende oplysninger om eventuelle virkninger på reproduktion og/eller udvikling, enten tidligt i vurderingen af kemikaliers toksikologiske egenskaber eller i forbindelse med problematiske kemikalier. Den kan også anvendes som led i en række indledende screeningstest af eksisterende kemikalier, om hvilke der kun foreligger få eller ingen toksikologiske oplysninger, som en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval ved mere omfattende reproduktions-/udviklingsrelaterede undersøgelser, eller når det ellers er relevant. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledende dokument nr. 19 om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (5).

▼M8

6. Denne forsøgsmetode giver ikke udtømmende oplysninger om alle aspekter af reproduktion og udvikling. Den giver navnlig kun begrænsede muligheder for at påvise postnatale tegn på prænatal eksponering eller virkninger, der induceres under postnatal eksponering. Bl.a. som følge af det relativt lave antal dyr i doseringsgrupperne, endepunkternes selektivitet og undersøgelsens korte varighed kan denne metode ikke bruges som endelig dokumentation for, at kemikalier ikke har nogen virkning. Når der ikke foreligger data fra andre reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, kan positive resultater desuden anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning.

7. De resultater, der opnås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (6). Inden for denne begrebsramme er den forbedrede OECD TG 421 omfattet af niveau 4 som et in vivo-assay, der giver data om skadelige virkninger på endokrinrelevante endepunkter. Et endokrint signal alene vil dog ikke nødvendigvis blive opfattet som tilstrækkelig dokumentation for, at testkemikaliet er et hormonforstyrrende stof.

8. I forsøgsmetoden indgives testkemikaliet oralt. Det kan være nødvendigt at ændre forsøgsmetoden, hvis der anvendes andre eksponeringsveje.

9. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

10. De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testkemikaliet indgives i graduerede doser til flere grupper hanner og hunner. Hannerne doseres i mindst fire uger og frem til og med dagen før planlagt aflivning (dette omfatter mindst to uger før parring, under parringsperioden og ca. to uger efter parring). I lyset af hannernes begrænsede doseringsperiode inden parring er deres fertilitet ikke nødvendigvis nogen særlig følsom indikator for testikeltoksicitet. Derfor er det særdeles vigtigt, at der foretages en detaljeret histologisk undersøgelse af testiklerne. Kombinationen af en doseringsperiode på to uger inden parring og efterfølgende parrings-/fertilitetsobservationer og en samlet doseringsperiode på mindst fire uger efterfulgt af en detaljeret histopatologisk undersøgelse af hannernes kønskirtler anses for at være tilstrækkeligt til at påvise størstedelen af virkningerne på hannernes fertilitet og spermatogenese.

12. Hunnerne doseres gennem hele undersøgelsen. Dette omfatter to uger inden parring (med det formål at dække mindst to hele brunstcyklusser), det variable tidsrum frem til befrugtning, drægtighedsperioden og mindst 13 dage efter fødslen frem til og med dagen før planlagt aflivning.

13. Undersøgelsens varighed efter tilvænning til forholdene og vurdering af brunstcyklussen før dosering afhænger af de enkelte hunner og er på ca. 63 dage [mindst 14 dage før parring, (op til) 14 dages parring, 22 dages drægtighed og 13 dages laktation].

▼M8

14. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives i løbet af forsøgsperioden, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne forsøgsmetode er beregnet til rotter. Hvis de parametre, der er anført i denne forsøgsmetode, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse herfor. I det internationale valideringsprogram for påvisning af hormonforstyrrende stoffer i OECD TG 407 (som svarer til kapitel B.7 i dette bilag) blev der kun anvendt rotter. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Der bør anvendes sunde jomfruelige dyr, som ikke tidligere har været brugt i forsøg. Forsøgsdyrene beskrives med hensyn til art, stamme, køn, vægt og alder. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem de anvendte dyr være mindst mulig og ikke over 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en længerevarende undersøgelse eller en undersøgelse af en hel generation, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og af samme oprindelse i begge undersøgelser.

Miljø og fodring

16. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej.

17. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis dette er sagligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Drægtige hunner bør anbringes alene i et bur og have adgang til redemateriale. Lakterende hunner anbringes alene i et bur sammen med deres afkom.

18. Foderet bør analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet bør opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Klargøring af dyrene

19. Sunde unge voksne dyr udvælges tilfældigt til kontrol- og behandlingsgrupperne. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de kan vænne sig til laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

20. Det anbefales, at testkemikaliet indgives oralt, medmindre andre indgivelsesveje er bedre egnede. Ved oral indgivelse indgives testkemikaliet normalt med sonde. Alternativt kan testkemikalier indgives via foder eller drikkevand.

▼M8

21. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikaliet i et egnet bærestof. Det anbefales, at man først vurderer muligheden for at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre bærestoffer. For andre bærestoffer end vand skal bærestoffets toksiske egenskaber være kendt. Testkemikaliets stabilitet og homogenitet i bærestoffet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

22. Det anbefales, at hver gruppe startes op med mindst 10 hanner og 12-13 hunner. Hunnernes brunstcyklus vurderes før eksponering, og dyr, der ikke udviser typiske fire-fem-dages cyklusser, medtages ikke i undersøgelsen. Derfor anbefales det at starte ud med ekstra hunner for at nå op på 10 hunner pr. gruppe. Medmindre der er tale om markante toksiske virkninger, forventes det, at dette vil give mindst otte drægtige hunner pr. gruppe, hvilket normalt er det lavest accepterede antal drægtige hunner pr. gruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af testkemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed, moderdyrenes adfærd og dieadfærd samt vækst og udvikling i F_1-generationen fra befrugtning og frem til dag 13 efter fødslen.

Dosering

23. Der bør anvendes generelt mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe. Dosisniveauerne kan baseres på oplysninger fra test af akut toksicitet eller på resultater fra undersøgelser med gentagen dosering. Bortset fra behandlingen med testkemikaliet bør dyr i kontrolgruppen behandles på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et bærestof til indgivelse af testkemikaliet, bør kontrolgruppen have den samme mængde bærestof som den gruppe, der modtager den største mængde bærestof.

24. Dosisniveauerne bør udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om toksicitet og (toksiko)kinetik. Der bør endvidere tages hensyn til, at der kan være forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det højeste dosisniveau bør vælges med henblik på at fremkalde toksiske virkninger, men ikke død eller alvorlig lidelse. Derefter bør en aftagende række dosisniveauer vælges, som giver mulighed for at påvise et eventuelt dosis/effekt-forhold, og som laveste dosis et niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres (NOAEL). Ved fastlæggelse af den aftagende række dosisniveauer svarer de optimale intervaller ofte til en faktor på to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem doseringerne.

25. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de endokrinfølsomme endepunkter fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

26. Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstændig undersøgelse med anvendelse af flere dosisniveauer betragtes som unødvendig. Grænsetesten gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere oralt dosisniveau. For andre indgivelsesmåder – f.eks. inhalation eller påføring på huden – kan testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for den maksimalt opnåelige koncentration.

▼M8

Indgivelse af doser

27. Dyrene modtager testkemikaliet hver dag syv dage om ugen. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, bør det gøres i en enkelt dosis med anvendelse af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Hvis der ikke er tale om irriterende eller ætsende testkemikalier, hvis virkninger sædvanligvis forstærkes ved højere koncentrationer, bør variabiliteten af testmængden minimeres ved justering af koncentrationen, således at der sikres en konstant mængde ved alle dosisniveauer.

28. Når testkemikalier indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliet ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliet indgives via foderet, kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrenes kropsvægt. Det anvendte alternativ bør anføres. Ved indgivelse med sonde bør dosis gives på nogenlunde samme tidspunkt hver dag og justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten.

Forsøgsplan

29. Doseringen af begge køn påbegyndes senest to uger før parring, efter at dyrene har haft mindst fem dage til at vænne sig til laboratorieforholdene, og hunnerne er blevet screenet for en normal brunstcyklus (i en tougersperiode forud for behandling). Undersøgelsen planlægges således, at vurderingen af brunstcyklus påbegyndes hurtigt efter, at dyrene er blevet fuldt kønsmodne. Dette kan variere en smule for de forskellige rottestammer i forskellige laboratorier og er f.eks. for Sprague Dawley-rotter, når dyrene er 10 uger gamle, og for Wistar-rotter, når de er omkring 12 uger gamle. Moderdyr og deres afkom aflives dag 13 efter fødslen eller umiddelbart derefter. Dagen for fødslen (dvs. hvor fødslen afsluttes) defineres som dag 0 efter fødslen. Hunner, der ikke udviser nogen tegn på kopulation, aflives 24-26 dage efter den sidste dag i parringsperioden. Doseringen fortsættes hos begge køn i parringsperioden. Hannerne bør stadig doseres efter parringsperioden, og mindst indtil den samlede doseringsperiode på mindst 28 dage er afsluttet. Derefter aflives de, eller doseringen fortsættes med henblik på eventuel fornyet parring, hvis dette findes hensigtsmæssigt.

30. Moderdyrene doseres hver dag gennem hele drægtighedsperioden og mindst frem til og med dag 13 efter fødslen eller dagen før aflivning. I undersøgelser, hvor testkemikaliet indgives ved inhalation eller påføring på huden, bør doseringen fortsættes mindst frem til og med dag 19 i drægtighedsperioden, og doseringen bør genoptages hurtigst muligt og senest PND 4.

31. Der findes et diagram over forsøgsplanen i tillæg 2.

Parringsmetode

32. I denne undersøgelse bør der normalt anvendes 1:1-parring (én han og én hun). Dette princip kan fraviges, hvis hannen skulle dø. Hunnen bør anbringes sammen med den samme han, indtil der observeres tegn på kopulation, eller indtil der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver morgen for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Dag 0 i drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor tegn på parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes.

▼M8

Kuldstørrelse

33. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, så hvert kuld i videst muligt omfang kommer til at bestå af fire eller fem unger pr. køn, alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme. Der bør tages blodprøver fra to af de overskydende unger, som samles og bruges til bestemmelse af T4-niveauer i serum. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt eller anogenital afstand (AGD), er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fire eller fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel. Ingen unger fjernes, når et kuld er på mindre end målet for fjernelse (otte eller 10 unger/kuld). Hvis der kun er én unge over målet for fjernelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

34. Hvis ikke kuldstørrelsen standardiseres, aflives to unger pr. kuld dag 4 efter fødslen, og der tages blodprøver til måling af thyreoideahormonkoncentrationer i serum. Hvis det er muligt, skal disse to unger pr. kuld være hununger, så hanungerne bevares til vurdering af bibeholdelsen af brystvorter, medmindre fjernelsen af disse to unger betyder, at der ikke er flere hunner tilbage til afsluttende vurdering. Der fjernes ingen unger, når kuldet er på mindre end otte eller 10 unger/kuld (alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme). Hvis der kun er én overskydende unge i forhold til den normale kuldstørrelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

Observationer i levende dyr

Kliniske observationer

35. Gennem hele testperioden bør der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationerne bør fortrinsvis finde sted på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn, herunder mortalitet, bør registreres. Disse registreringer bør omfatte tidspunktet for toksicitetstegnenes indtræden, grad og varighed.

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

36. Han- og hundyr bør vejes den dag, doseringen indledes, og derefter mindst en gang om ugen og ved forsøgets afslutning. I drægtighedsperioden bør hunnerne vejes på dag 0, 7, 14 og 20 og senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og 13 efter fødslen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert voksent dyr.

37. Før parring og i drægtigheds- og laktationsperioden bør foderindtaget måles mindst en gang om ugen. Måling af foderindtaget i parringsperioden er valgfrit. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, bør vandindtagelsen i disse perioder også måles.

Brunstcyklusser

38. Brunstcyklusserne bør overvåges, inden behandlingen indledes, for at udvælge de hunner til undersøgelsen, der har en regelmæssig cyklus (jf. punkt 22). Vaginalt smear bør også overvåges dagligt fra behandlingens indledning, og indtil der findes tegn på parring. Hvis der er problemer med akutte stressvirkninger, der kan ændre brunstcyklussen, når doseringen

▼M8

indledes, kan laboratorierne eksponere forsøgsdyrene i to uger og derefter indsamle vaginalt smear hver dag i mindst to uger før parring for at overvåge brunstcyklussen og fortsætte overvågningen i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring. Udtagning af celleprøver fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå at forstyrre slimhinden, hvilket ellers kunne inducere pseudodrægtighed (7) (8).

Parametre for afkom

39. Drægtighedsperioden bør registreres og beregnes fra drægtighedsdag 0. Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen til bestemmelse af ungernes antal og køn, dødfødte, levendefødte, små uudviklede unger (unger, der er signifikant mindre end ungerne i kontrolgruppen) og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter.

40. De levende unger tælles, og deres køn bestemmes, og kuldet vejes senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og 13 efter fødslen. Ud over observationerne i punkt 35 bør al unormal adfærd hos afkommet registreres.

41. Ungernes AGD bør måles den samme dag efter fødslen mellem PND 0 og PND 4. Ungernes kropsvægt bør registreres den dag, AGD måles, og AGD bør normaliseres til et mål for ungernes størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (9). Antallet af brystvorter/areolae hos hanungerne tælles på PND 12 eller 13 som anbefalet i OECD GD 151 (10).

Klinisk biokemi

42. Der tages blodprøver fra et bestemt sted i henhold til nedenstående:

— fra mindst to unger pr. kuld på dag 4 efter fødslen, hvis antallet af unger gør det muligt (jf. punkt 33-34)

— fra alle moderdyr og mindst to unger pr. kuld ved forsøgets afslutning på dag 13 og

— fra alle voksne hanner ved forsøgets afslutning.

Alle blodprøver opbevares under egnede forhold. Blodprøver fra dag 13-unger og voksne hanner undersøges for niveauet af thyreoideahormoner (T4) i serum. Der kan eventuelt foretages yderligere vurdering af T4 i blodprøver fra moderdyr og dag 4-unger. Andre hormoner kan eventuelt også måles. Blod fra unger til thyreoideahormonanalyse kan samles pr. kuld. Thyreoideahormoner (T4 og TSH) bør fortrinsvis måles som en samlet værdi.

43. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer i hormonanalyserne:

— aflivningstidspunkt på grund af de forskellige hormonkoncentrationer i løbet af døgnet

— aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødig stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne

— analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

▼M8

44. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på nogenlunde samme tidspunkt på dagen. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet.

Patologi

Makroskopisk undersøgelse

45. På aflivningstidspunktet eller ved død under forsøget undersøges de voksne dyr makroskopisk for eventuelle abnormiteter eller patologiske forandringer. Særlig opmærksomhed bør rettes mod kønsorganerne. Antallet af implantationssteder bør registreres. Det vaginale smear bør undersøges om morgenen på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af ovarierne.

46. På alle voksne handyr renses testikler og bitestikler samt prostata og vesiculae seminales og prostata anterior som én samlet enhed for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Derudover kan eventuelle organvejninger omfatte levator ani plus bulbocavernosus-muskelkomplekset, Cowpers kirtler og glans penis i hanner samt parrede ovarier (våd vægt) og uterus (herunder cervix) i hunner. Disse valgfrie vejninger bør foretages hurtigst muligt efter dissektion.

47. Døde unger og unger, der aflives på dag 13 efter fødslen eller hurtigt derefter, bør som minimum undersøges omhyggeligt på kroppens ydre for større abnormiteter. Særlig opmærksomhed bør udvises over for de eksterne kønsorganer, som bør undersøges for tegn på forandringer i udviklingen. På dag 13 præserveres skjoldbruskkirtlen fra en han- og en hununge pr. kuld.

48. Ovarier, testikler, sekundære kønsorganer (uterus og cervix, bitestikler, prostata, vesiculae seminales og prostata anterior), skjoldbruskkirtel og alle organer, der udviser makroskopiske læsioner, fra alle voksne dyr præserveres. Fiksering med formalin anbefales ikke til rutinemæssig undersøgelse af testikler og bitestikler. Anvendelse af Bouins væske eller modificeret Davidson-fikseringsmiddel er en acceptabel metode til præservering af dette væv (11). Tunica albuginea kan punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyle, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet.

Histopatologisk undersøgelse

49. Der bør foretages en detaljeret histologisk undersøgelse af ovarier, testikler og bitestikler (hvor der lægges særlig vægt på spermatogenesens faser og histopatologien af den interstitielle cellestruktur i testiklerne) fra dyrene i højdosisgruppen og kontrolgruppen. De øvrige præserverede organer, herunder skjoldbruskkirtler fra unger og voksne dyr, kan undersøges om nødvendigt. Skjoldbruskkirtlens vægt kan bestemmes efter fiksering. Rensningen for vedhængende væv bør også foretages meget omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse. Undersøgelserne skal udvides til dyrene i de andre doseringsgrupper, hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen. I vejledningen om histopatologi (11) findes der flere oplysninger om dissektion, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

▼M8

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Der bør fremlægges data om hvert enkelt dyr. Derudover bør alle data sammenfattes i tabelform med angivelse for hver forsøgsgruppe af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humane grunde, tidspunkt for eventuel død eller human aflivning, antal fertile dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de histopatologiske forandringer og alle relevante data om kuldene. Tillæg 3 indeholder en sammenfattende rapport i tabelform, der har vist sig at være særdeles velegnet til vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger.

51. Som følge af undersøgelsens begrænsede omfang er de statistiske analyser i form af test for »signifikans« af begrænset værdi for mange endepunkter, især de reproduktionsrelaterede endepunkter. Hvis der anvendes statistiske analyser, bør den valgte metode være egnet til fordeling af de undersøgte variabler og vælges, inden undersøgelsen indledes. Statistiske analyser af AGD og bibeholdelse af brystvorter (»nipple retention«) bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til virkninger på de enkelte kuld. Når det er hensigtsmæssigt, er det kuldene, der er analyseenheden. Statistiske analyser af ungernes kropsvægt bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til kuldstørrelsen. På grund af den lille gruppestørrelse kan anvendelsen af historiske kontroldata (om f.eks. kuldstørrelse), når sådanne foreligger, også være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.

Vurdering af resultater

52. Resultaterne af denne toksicitetsundersøgelse bør vurderes med hensyn til de observerede virkninger samt obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng mellem dyrenes eksponering for testkemikaliet og tilstedeværelse eller fravær, forekomst og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske læsioner, identificerede målorganer, manglende fertilitet, unormale kliniske fund, påvirkning af reproduktions- og ynglepræstationer, ændringer af kropsvægt, indvirkning på mortaliteten og eventuelle andre toksiske virkninger.

53. På grund af hannernes korte behandlingsperiode bør histopatologien for testikler og bitestikler ses i sammenhæng med fertilitetsdataene ved vurdering af den reproduktionsmæssige virkning på hannerne. Anvendelsen af historiske kontroldata om reproduktion/udvikling (f.eks. med hensyn til kuldstørrelse, AGD, bibeholdelse af brystvorter (»nipple retention«), T4-niveauer i serum) kan også, når sådanne foreligger, være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.

54. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at der beregnes variationskoefficienter for numeriske data, især for parametre med relation til påvisning af hormonforstyrrende virkninger. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske undersøgelser evalueres.

Testrapport

55. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

▼**M8**

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Eventuelt bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof, hvis dette ikke er vand.

Forsøgsdyr:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse

— begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om formulering af testkemikalie eller iblanding heraf i foderet, opnået koncentration, foderblandingens stabilitet og homogenitet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— eventuel omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af randomiseringsproceduren til eventuel udvælgelse af unger til fjernelse.

Resultater:

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse og indtagelse af vand, hvis disse data foreligger

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og andre tegn på toksicitet

— drægtighedsperiodens længde

— toksiske eller andre virkninger på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ej)

— antal voksne hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklusvarighed

— antal levendefødte og postimplantationstab

— data om ungernes kropsvægt

— AGD for alle unger (og kropsvægt på dagen for AGD-måling)

▼M8

— bibeholdelse af brystvorter (»Nipple retention«) hos hanunger

— thyreoideahormonniveauer, dag 13-unger og voksne hanner (og eventuelt moderdyr og dag 4-unger)

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter, makroskopisk vurdering af eksterne genitalia, antal små uudviklede unger

— dødstidspunkt under undersøgelsen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning

— antal implantationer, kuldstørrelse og kuldenes vægt på registreringstidspunktet

— kropsvægt ved aflivning og organvægt for forældredyrene

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— absorptionsdata (hvis de foreligger)

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultater

Konklusioner

Fortolkning af resultater

56. Ved denne undersøgelse vurderes den reproduktions-/udviklingsmæssige toksicitet i forbindelse med gentagen dosering (jf. punkt 5 og 6). Den kan vise, om det er nødvendigt at foretage yderligere undersøgelser, og udstikker retningslinjer for udformningen af efterfølgende undersøgelser. Med hensyn til fortolkningen af de reproduktions- og udviklingsrelaterede resultater henvises til OECD's vejledende dokument 43 (12). OECD's vejledende dokument nr. 106 om histologisk vurdering af endokrine og reproduktionsrelaterede test i gnavere (11) indeholder oplysninger om præpareringen og vurderingen af (endokrine) organer og vaginalt smear, der kan være nyttige i forbindelse med denne testvejledning.

LITTERATUR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. og Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. og Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. og Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER (SE OGSÅ OECD GD 150 (6))

Androgenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Udviklingstoksicitet: manifestering af reproduktionstoksicitet, som repræsenterer prænatale, perinatale, postnatale, strukturelle eller funktionsmæssige forstyrrelser i afkommet.

Dosering: et generelt udtryk, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Dosis: mængden af indgivet testkemikalie. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgivelse af testkemikaliet. Disse tegn bør være tilstrækkelige til farevurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udvikling af svære toksiske virkninger og sandsynligvis død.

Fertilitetsforringelse: forstyrrelse af hanners eller hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Toksisk virkning på moderdyret: skadelig virkning på drægtige hunner, der opstår enten specifikt (direkte virkning) eller ikke-specifikt (indirekte virkning).

NOAEL: forkortelse for "no-observed-adverse-effect level" (niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres). Dette er det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede skadelige virkninger.

Østrogenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Reproduktionstoksicitet: fremkaldelse af skadelige virkninger på afkommet og/eller forringelse af hanners og hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

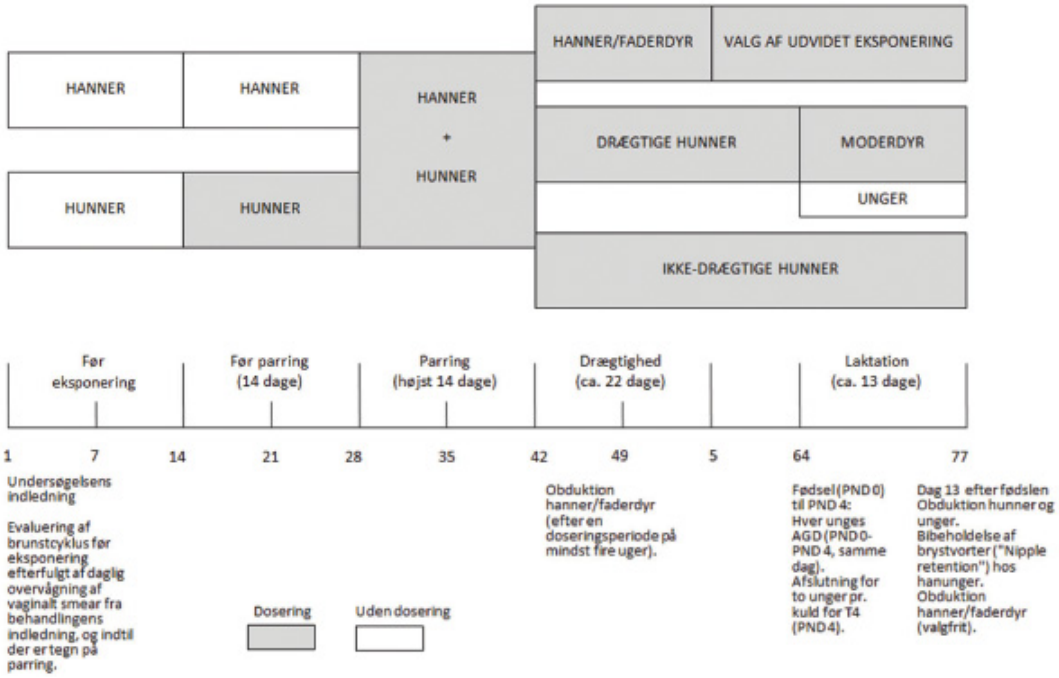
Thyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

Validering: en videnskabelig proces til karakterisering af en forsøgsmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvisning af dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

▼**M8**

Tillæg 2

DIAGRAM OVER FORSØGSPLANEN, SOM VISER DEN MAKSIMALE VARIGHED AF UNDERSØGELSEN BASERET PÅ EN FULD 14-DAGES PARRINGSPERIODE



▼**M8**

Tillæg 3

SAMMENFATTENDE RAPPORT I TABELFORM OVER REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSMÆSSIGE VIRKNINGER

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Dosering (enheder)	0 (kontrol)	…	…	…	…
Startede par (N)					
Brunstcyklus (som minimum gennemsnitlig varighed og frekvens for uregelmæssige cyklusser)					
Hunner, som viser tegn på kopulation (N)					
Hunner, som bliver drægtige (N)					
Undfangelse, dag 1-5 (N)					
Undfangelse, dag 6-… ([1]) (N)					
Drægtighed ≤ 21 dage (N)					
Drægtighed = 22 dage (N)					
Drægtighed 23 ≥ dage (N)					
Moderdyr med levende nyfødte unger (N)					
Moderdyr med levende unger på dag 4 efter fødslen (N)					
Implantater/moderdyr (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr ved fødslen (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr på dag 4 (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) ved fødslen (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) på dag 4 (gennemsnit)					
Kuldenes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Kuldenes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ungernes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Ungernes vægt på tidspunktet for AGD-måling (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner)					

▼**M8**

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Dosering (enheder)	0 (kontrol)	…	…	…	…
Ungernes AGD på den samme dag efter fødslen, fødsel – dag 4 (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner, PND-angivelse)					
Ungernes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Hanungernes bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") på dag 13 (gennemsnit)					
Ungernes vægt på dag 13 (gennemsnit)					
UNGER MED ABNORMITETER					
Moderdyr med 0					
Moderdyr med 1					
Moderdyr med ≥ 2					
TAB AF AFKOM					
Prænatalt/efter implantation (implantationer minus levendefødte)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					
Postnatalt (levendefødte minus levende på dag 13 efter fødslen)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					

([1]) sidste dag i parringsperioden

▼M8

B.64. KOMBINERET SCREENINGSTEST FOR TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING OG REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSTOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 422 (2016). OECD-vejledningerne om testning af kemikalier bliver revideret regelmæssigt på baggrund af den videnskabelige udvikling. Den oprindelige screeningstestvejledning 422 blev vedtaget i 1996 med udgangspunkt i en protokol for en kombineret screeningstest for gentagen dosering og reproduktion/udvikling (»Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test«), der blev drøftet på to ekspertmøder i henholdsvis London i 1990 (1) og Tokyo i 1992 (2).

2. Denne forsøgsmetode kombinerer screening for reproduktions-/udviklingstoksicitet, som er baseret på de erfaringer, medlemsstaterne har gjort ved anvendelse af den oprindelige metode på eksisterende kemikalier, der fremstilles i store mængder, i forsøg med positive kontrolstoffer (3) (4) med screening for toksicitet ved gentagen dosering i overensstemmelse med OECD-testvejledning 407 (toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere, der svarer til kapitel B.7 i dette bilag).

3. Denne forsøgsmetode er blevet opdateret med endepunkter for hormonforstyrrende stoffer som en opfølgning på de højt prioriterede aktiviteter, som OECD indledte i 1998 for at revidere eksisterende testvejledninger og udvikle nye testvejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer (5). I denne forbindelse blev testvejledning 407 (der svarer til kapitel B.7 i dette bilag) i 2008 forbedret med parametre, der er egnede til påvisning af testkemikaliers endokrine virkemåde. Formålet med at opdatere testvejledning 422 var at indlemme endepunkter for hormonforstyrrende stoffer i testvejledningerne om screening, hvor eksponeringsperioderne omfatter følsomme udviklingsmæssige perioder (prænatale eller tidligt postnatale perioder).

4. De valgte supplerende endepunkter for hormonforstyrrende stoffer, som også er at finde i testvejledning 443 (udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation, som svarer til kapitel B.56 i dette bilag), blev indlemmet i testvejledning 422 på baggrund af en feasibilityundersøgelse, hvor der blev set på de videnskabelige og tekniske spørgsmål i forbindelse med deres indlemmelse samt eventuelle tilpasninger af testens udformning som følge heraf (6).

5. Denne forsøgsmetode er beregnet til at generere begrænsede oplysninger om et testkemikalies virkninger på han- og hundyrs reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel. Den er ikke et alternativ til og erstatter ikke de eksisterende forsøgsmetoder B.31, B.34, B.35 og B.56.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Efter udførelse af en akut test med henblik på indledende vurdering af et testkemikalies toksicitet, kan der udføres en oral toksicitetstest ved anvendelse af gentagen dosering til bestemmelse og vurdering af testkemikaliets toksiske egenskaber. Denne undersøgelse skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i en relativt begrænset periode. Metoden omfatter den grundlæggende undersøgelse for toksicitet ved gentagen dosering, der kan bruges til kemikalier, for hvilke en 90-dages undersøgelse ikke er berettiget (f.eks. når produktionsmængden ikke overstiger visse grænser), eller som en forundersøgelse forud for en langtidsundersøgelse. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledende dokument nr. 19 om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (7).

▼**M8**

7. Forsøgsmetoden omfatter desuden en screeningstest for reproduktions-/udviklingstoksicitet og kan derfor også anvendes til indhentning af indledende oplysninger om eventuelle virkninger på han- og hundyrs reproduktionsevne, herunder kønskirtlernes funktion, parringsadfærd, befrugtning, conceptus' udvikling og fødsel, enten tidligt i vurderingen af testkemikaliers toksikologiske egenskaber eller i forbindelse med problematiske kemikalier. Denne forsøgsmetode giver ikke udtømmende oplysninger om alle aspekter af reproduktion og udvikling. Den giver navnlig kun begrænsede muligheder for at påvise postnatale tegn på prænatal eksponering eller virkninger, der induceres under postnatal eksponering. Bl.a. som følge af endepunkternes selektivitet og undersøgelsens korte varighed kan denne metode ikke bruges som endelig dokumentation for, at kemikalier ikke har nogen reproduktions-/udviklingsmæssig virkning. Når der ikke foreligger data fra andre reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, kan positive resultater desuden anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning.

8. De resultater, der opnås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (8). Inden for denne begrebsramme er den forbedrede OECD TG 422 omfattet af niveau 4 som et in vivo-assay, der giver data om skadelige virkninger på endokrinrelevante endepunkter. Et endokrint signal alene vil dog ikke nødvendigvis blive opfattet som tilstrækkelig dokumentation for, at testkemikaliet er et hormonforstyrrende stof.

9. Med denne metode lægges der også vægt på neurologiske virkninger som et specifikt endepunkt, og dyrene skal underkastes omhyggelige kliniske observationer med henblik på indhentning af flest mulige oplysninger. Metoden tager sigte på at identificere kemikalier med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nærmere. Herudover kan metoden også vise, om der er grundlæggende tegn på immunologiske virkninger.

10. Når der ikke foreligger data fra andre systemiske toksicitetstest, reproduktions-/udviklingstoksicitetstest, neurotoksicitetstest og/eller immunotoksicitetstest, kan positive resultater anvendes til indledende farevurdering og som udgangspunkt for beslutninger om nødvendigheden af og tidsplanen for yderligere testning. Testen kan være særdeles egnet i forbindelse med OECD's Screening Information Data Set (SIDS) ved vurdering af eksisterende kemikalier, for hvilke der kun foreligger få eller ingen toksikologiske oplysninger, og kan bruges som et alternativ til at udføre to separate test for henholdsvis toksicitet ved gentagen dosering (OCD TG 407, der svarer til kapitel B.7 i dette bilag) og reproduktions-/udviklingstoksicitet (OECD TG 421, der svarer til kapitel B.63 i dette bilag). Den kan endvidere anvendes som en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval ved mere omfattende reproduktions-/udviklingsrelaterede undersøgelser, eller når det ellers findes relevant.

11. Generelt formodes det, at der er forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det kan derfor være mere kompliceret at bestemme dosisniveauer i denne kombinerede test, som er egnede til både at evaluere generel systemisk toksicitet og specifik reproduktions-/udviklingstoksicitet, end når testene foretages enkeltvis. Derudover kan det være vanskeligere at fortolke testresultaterne med hensyn til generel systemisk toksicitet, end når der foretages en separat undersøgelse med gentagen dosering, især når serum- og histopatologiparametrene ikke samtidig vurderes i undersøgelsen. På grund af

▼M8

disse tekniske vanskeligheder kræver det omfattende erfaring med toksicitetstestning at foretage denne kombinerede screeningstest. Ud over det mindre antal anvendte dyr kan den kombinerede test på den anden side også være bedre til at skelne mellem de direkte reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger og dem, der er sekundære i forhold til andre (systemiske) virkninger.

12. I denne test er doseringsperioden længere end de sædvanlige 28 dage for en undersøgelse med gentagen dosering. Til gengæld bruges der færre dyr af hvert køn pr. gruppe i forhold til, når der gennemføres en undersøgelse med gentagen dosering på de sædvanlige 28 dage ud over en screeningstest for reproduktions-/udviklingstoksicitet.

13. I forsøgsmetoden indgives testkemikaliet oralt. Det kan være nødvendigt at ændre forsøgsmetoden, hvis der anvendes andre eksponeringsveje.

14. Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

15. De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

16. Testkemikaliet indgives i graduerede doser til flere grupper hanner og hunner. Hannerne doseres i mindst fire uger frem til og med dagen før planlagt aflivning (dette omfatter mindst to uger før parring, under parringsperioden og ca. to uger efter parring). I lyset af hannernes begrænsede doseringsperiode inden parring er deres fertilitet ikke nødvendigvis nogen særlig følsom indikator for testikeltoksicitet. Derfor er det særdeles vigtigt, at der foretages endetaljeret histologisk undersøgelse af testiklerne. Kombinationen af en doseringsperiode på to uger inden parring og efterfølgende parrings-/fertilitetsobservationer og en samlet doseringsperiode på mindst fire uger efterfulgt af en detaljeret histopatologisk undersøgelse af hannernes kønskirtler anses for at være tilstrækkeligt til at påvise størstedelen af virkningerne på hannernes fertilitet og spermatogenese.

17. Hunnerne doseres gennem hele undersøgelsen. Dette omfatter to uger inden parring (med det formål at dække mindst to hele brunstcyklusser), det variable tidsrum frem til befrugtning, drægtighedsperioden og mindst 13 dage efter fødslen frem til og med dagen før planlagt aflivning.

18. Undersøgelsens varighed efter tilvænning til forholdene og vurdering af brunstcyklussen før dosering afhænger af de enkelte hunner og er på ca. 63 dage [mindst 14 dage før parring, (op til) 14 dages parring, 22 dages drægtighed og 13 dages laktation].

19. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

▼M8

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

20. Denne forsøgsmetode er beregnet til rotter. Hvis de parametre, der er anført i denne TG 422, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse herfor. I det internationale valideringsprogram for påvisning af hormonforstyrrende stoffer vedrørende TG 407 blev der kun anvendt rotter. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Der bør anvendes sunde jomfruelige dyr, som ikke tidligere har været brugt i forsøg. Forsøgsdyrene beskrives med hensyn til art, stamme, køn, vægt og alder. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en længerevarende undersøgelse eller en undersøgelse af en hel generation, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og af samme oprindelse i begge undersøgelser.

Miljø og fodring

21. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej.

22. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis dette er sagligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Drægtige hunner bør anbringes alene i et bur og have adgang til redemateriale. Lakterende hunner anbringes alene i et bur sammen med deres afkom.

23. Foderet bør analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet bør opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Klargøring af dyrene

24. Sunde unge voksne dyr fordeles vilkårligt i forsøgsgrupper og bure. Burene anbringes på en sådan måde, at de mulige følger af burenes placering minimeres. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de kan vænne sig til laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

25. Det anbefales, at testkemikaliet indgives oralt, medmindre andre indgivelsesveje er bedre egnede. Ved oral indgivelse indgives testkemikaliet normalt med sonde. Alternativt kan testkemikalier dog også indgives via foder eller drikkevand.

26. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikaliet i et egnet bærestof. Det anbefales, at man først vurderer muligheden for at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre bærestoffer. For ikke-vandige bærestoffer skal bærestoffets toksiske egenskaber være kendt. Testkemikaliets stabilitet og homogenitet i bærestoffet skal bestemmes.

▼M8

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

27. Det anbefales, at hver gruppe startes op med mindst 10 hanner og 12-13 hunner. Hunnernes brunstcyklus vurderes før eksponering, og dyr, der ikke udviser typiske fire-fem-dages cyklusser, medtages ikke i undersøgelsen. Derfor anbefales det at starte ud med ekstra hunner for at nå op på 10 hunner pr. gruppe. Medmindre der er tale om markante toksiske virkninger, forventes det, at dette vil give mindst otte drægtige hunner pr. gruppe, hvilket normalt er det lavest accepterede antal drægtige hunner pr. gruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af testkemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed, moderdyrenes adfærd og dieadfærd samt vækst og udvikling i F_1-generationen fra befrugtning og frem til dag 13 efter fødslen. Hvis der påregnes aflivning af dyr under undersøgelsen, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, der påregnes aflivet i løbet af undersøgelsen. Det kan overvejes at udsætte en yderligere satellitgruppe på fem dyr af hvert køn i kontrolgruppen og i gruppen med den højeste dosis, således at man kan observere evt. reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af systemisk toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Dyrene i satellitgruppen parres ikke og vil derfor ikke blive anvendt til vurdering af reproduktions-/udviklingstoksicitet.

Dosering

28. Der bør anvendes generelt mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe. Foreligger der ikke egnede data om generel toksicitet, kan der udføres en forundersøgelse til bestemmelse af dosisinterval (dyr af samme stamme og herkomst) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandlingen med testkemikaliet bør dyr i kontrolgruppen behandles på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et bærestof til indgivelse af testkemikaliet, bør kontrolgruppen have den samme mængde bærestof som den gruppe, der modtager den største mængde bærestof.

29. Dosisniveauerne bør udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om toksicitet og (toksiko)kinetik. Der bør endvidere tages hensyn til, at der kan være forskel på følsomheden hos drægtige og ikke-drægtige dyr. Det højeste dosisniveau bør vælges med henblik på at fremkalde toksiske virkninger, men ikke død eller åbenlys lidelse. Derefter vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise et eventuelt dosis/effekt-forhold og ingen skadelige virkninger ved det laveste dosisniveau. De optimale intervaller svarer ofte til en faktor på to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne.

30. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de endokrinfølsomme endepunkter fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

31. Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet (baseret på kropsvægten) med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstændig undersøgelse med anvendelse af flere dosisniveauer betragtes som

▼M8

unødvendig. Grænsetesten gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau. For andre indgivelsesmåder – f.eks. inhalation eller påføring på huden – kan testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for den maksimalt opnåelige eksponering.

Indgivelse af doser

32. Dyrene modtager testkemikaliet hver dag syv dage om ugen. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, bør det gøres i en enkelt dosis med anvendelse af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Hvis der ikke er tale omirriterende eller ætsende testkemikalier, hvis virkninger sædvanligvis forstærkes ved højere koncentrationer, bør variabiliteten af testmængden minimeres ved justering af koncentrationen, således at der sikres en konstant mængde ved alle dosisniveauer.

33. Når testkemikaliet indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliet ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliet indgives via foderet, kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrenes kropsvægt. Det anvendte alternativ bør anføres. Ved indgivelse med sonde bør dosis gives på nogenlunde samme tidspunkt hver dag og justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Hvis den kombinerede undersøgelse anvendes som forløber for en længerevarende eller fuldstændig reproduktionstoksicitetsundersøgelse, skal der i begge undersøgelser gives samme fodersammensætning.

Forsøgsplan

34. Doseringen af begge køn påbegyndes to uger før parring, efter at dyrene har haft mindst fem dage til at vænne sig til laboratorieforholdene, og hunnerne er blevet screenet for en normal brunstcyklus (i en tougersperiode forud for behandling). Undersøgelsen planlægges således, at vurderingen af brunstcyklus påbegyndes hurtigt efter, at dyrene er blevet fuldt kønsmodne. Dette kan variere en smule for de forskellige rottestammer i forskellige laboratorier og er f.eks. for Sprague Dawley-rotter, når dyrene er 10 uger gamle, og for Wistar-rotter, når de er omkring 12 uger gamle. Moderdyr og deres afkom aflives dag 13 efter fødslen eller umiddelbart derefter. For at moderdyrene skal kunne faste natten over forud for blodprøvetagning (hvis dette foretrækkes), skal moderdyrene og deres afkom ikke nødvendigvis aflives samme dag. Dagen for fødslen (dvs. hvor fødslen afsluttes) defineres som dag 0 efter fødslen. Hunner, der ikke udviser nogen tegn på kopulation, aflives 24-26 dage efter den sidste dag i parringsperioden. Doseringen fortsættes hos begge køn i parringsperioden. Hannerne bør stadig doseres efter parringsperioden, og mindst indtil den samlede doseringsperiode på mindst 28 dage er afsluttet. Derefter aflives de, eller doseringen fortsættes med henblik på eventuel fornyet parring, hvis dette findes hensigtsmæssigt.

35. Moderdyrene doseres hver dag gennem hele drægtighedsperioden og mindst frem til og med dag 13 efter fødslen eller dagen før aflivning. I undersøgelser, hvor testkemikaliet indgives ved inhalation eller påføring på huden, bør doseringen fortsættes mindst frem til og med dag 19 i drægtighedsperioden, og doseringen bør genoptages hurtigst muligt og senest den fjerde dag efter fødslen (PND 4).

▼M8

36. Eventuelle dyr i en satellitgruppe, der anvendes til opfølgningsobservationer, parres ikke. De holdes mindst i yderligere 14 dage efter den planlagte aflivning af moderdyrene uden indgivelse af testkemikalie, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.

37. Der findes et diagram over forsøgsplanen i tillæg 2.

Brunstcyklusser

38. Brunstcyklusserne bør overvåges, inden behandlingen indledes, for at udvælge de hunner til undersøgelsen, der har en regelmæssig cyklus (jf. punkt 27). Vaginalt smear bør også overvåges dagligt fra behandlingens indledning, og indtil der findes tegn på parring. Hvis der er problemer med akutte stressvirkninger, der kan ændre brunstcyklussen, når doseringen indledes, kan laboratorierne eksponere forsøgsdyrene i to uger og derefter indsamle vaginalt smear hver dag for at overvåge brunstcyklussen i mindst to uger før parring og fortsætte overvågningen i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring. Udtagning af celleprøver fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå at forstyrre slimhinden, hvilket ellers kunne inducere pseudodrægtighed (8) (9).

Parringsmetode

39. I denne undersøgelse bør der normalt anvendes 1:1-parring (én han og én hun). Dette princip kan fraviges, hvis hannen skulle dø. Hunnen bør anbringes sammen med den samme han, indtil der observeres tegn på kopulation, eller indtil der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver morgen for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Dag 0 i drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor tegn på parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes.

Kuldstørrelse

40. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, så hvert kuld i videst muligt omfang kommer til at bestå af fire eller fem unger pr. køn, alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme. Der tages blodprøver fra to af de overskydende unger, som samles og bruges til bestemmelse af T4-niveauer i serum. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt eller anogenital afstand (AGD), er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fire eller fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel. Ingen unger fjernes, når et kuld er på mindre end målet for fjernelse (otte eller 10 unger/kuld). Hvis der kun er én unge over målet for fjernelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

41. Hvis ikke kuldstørrelsen standardiseres, aflives to unger pr. kuld dag 4 efter fødslen, og der tages blodprøver til måling af thyreoideahormonkoncentrationer i serum. Hvis det er muligt, skal disse to unger pr. kuld være hununger, så hanungerne bevares til vurdering af bibeholdelsen af brystvorter, medmindre fjernelsen af disse to unger betyder, at der ikke er flere hunner tilbage til afsluttende vurdering. Der fjernes ingen unger, når kuldet er på mindre end otte eller 10 unger/kuld (alt efter den normale kuldstørrelse i den anvendte rottestamme). Hvis der kun er én overskydende unge i forhold til den normale kuldstørrelse, vil der kun blive fjernet én unge, som vil blive brugt til indsamling af blod til eventuel vurdering af T4 i serum.

▼M8

Observationer

42. Der bør foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Dyrenes helbredstilstand bør registreres. Dyrene observeres for morbiditet og mortalitet mindst to gange om dagen.

43. Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle forældredyr. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke. Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver dag. De bør registreres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, der udtrykkeligt er defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at testbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. rettes mod ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Derudover registreres forandringer i gang, holdning og respons på håndtering såvel som forekomst af kloniske eller toniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven soignering, repetitive cirkelbevægelser), vanskelig eller langvarig fødsel eller mærkelig adfærd (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) (10).

44. Én gang i løbet af undersøgelsen vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (8) (9) (11), gribestyrke (12) og motorisk aktivitet (13) hos fem hanner og fem hunner, der udvælges vilkårligt fra hver gruppe. Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes. Hos hannerne bør disse funktionelle observationer foretages i slutningen af doseringsperioden, kort tid inden den planlagte aflivning, men inden der tages blodprøve til hæmatologi eller klinisk kemi (jf. punkt 53-56, også fodnote 1). Hunnerne bør være i fysiologisk samme tilstand under disse funktionelle test og skal helst testes én gang i løbet af den sidste laktationsuge (f.eks. LD 6-13), kort tid inden den planlagte aflivning. Moderdyr og unger holdes adskilt i så kort tid som muligt.

45. Funktionelle observationer, der foretages én gang i slutningen af undersøgelsen, kan udelades, hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet (90 dage) eller en længerevarende undersøgelse. I så fald bør de funktionelle observationer medtages i den opfølgende undersøgelse. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra denne undersøgelse med gentagen dosering lette valget af dosisniveauer for en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet eller en længerevarende undersøgelse.

46. I undtagelsestilfælde kan funktionelle observationer ligeledes udelades for grupper, der viser så tydelige tegn på toksicitet, at det i signifikant grad ville indvirke på resultaterne af den funktionelle test.

47. Drægtighedsperioden bør registreres og beregnes fra drægtighedsdag 0. Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen til bestemmelse af ungernes antal og køn, dødfødte, levendefødte, små uudviklede unger (unger, der er signifikant mindre end ungerne i kontrolgruppen) og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter.

▼M8

48. De levende unger tælles, og deres køn bestemmes, og kuldet vejes senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og dag 13 efter fødslen. Ud over observationerne på forældredyr (jf. punkt 43 og 44) skal al unormal adfærd hos afkommet også registreres.

49. Ungernes AGD bør måles den samme dag efter fødslen mellem PND 0 og PND 4. Ungernes kropsvægt registreres den dag, AGD måles, og AGD normaliseres til et mål for ungens størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (14). Antallet af brystvorter/areolae hos hanungerne tælles på PND 12 eller 13 som anbefalet i OECD GD 151 (15).

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

50. Han- og hundyr bør vejes den dag, doseringen indledes, og derefter mindst en gang om ugen og ved forsøgets afslutning. I drægtighedsperioden vejes hunnerne på dag 0, 7, 14 og 20 og senest 24 timer efter fødslen (dag 0 eller 1 efter fødslen) samt mindst på dag 4 og dag 13 efter fødslen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert voksent dyr.

51. Før parring og i drægtigheds- og laktationsperioden bør foderindtaget måles mindst en gang om ugen. Måling af foderindtaget i parringsperioden er valgfrit. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, skal vandindtagelsen i disse perioder også måles.

Hæmatologi

52. Én gang i løbet af undersøgelsen foretages følgende hæmatologiske undersøgelser på fem hanner og fem hunner, der udvælges vilkårligt fra hver gruppe: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, retikulocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og måling af blodets koaguleringsevne/-tid. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliet eller dets putative metabolitter har eller mistænkes for at have oxiderende egenskaber, omfatter methæmoglobinkoncentration og Heinz-legemer.

53. Der bør tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted. Hunnerne bør være i fysiologisk samme tilstand ved blodprøvetagning. For at undgå praktiske problemer som følge af de forskellige tidspunkter for drægtighedsperiodernes indledning kan blodprøver fra hunnerne tages ved udløbet af perioden før parring i stedet for umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Blodprøver fra hannerne bør fortrinsvis tages umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Som et alternativ er det også muligt at tage blodprøver fra hannerne ved udløbet af perioden før parring, hvis der tages blodprøver fra hunnerne på dette tidspunkt.

54. Alle blodprøver opbevares under egnede forhold.

Klinisk biokemi

55. Klinisk-biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra de udvalgte fem hanner og fem hunner fra hver

▼M8

gruppe. Det anbefales, at dyrene faster natten over forud for blodprøvetagning ([1]). Undersøgelser af plasma eller serum bør omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase og sorbitol dehydrogenase) og galdesyrer. Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og bilirubin kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.

56. Der tages blodprøver fra et bestemt sted i henhold til nedenstående:

— fra mindst to unger pr. kuld på dag 4 efter fødslen, hvis antallet af unger gør det muligt (jf. punkt 40-41)

— fra alle moderdyr og mindst to unger pr. kuld ved forsøgets afslutning på dag 13 og

— fra alle voksne hanner ved forsøgets afslutning.

Alle blodprøver opbevares under egnede forhold. Blodprøver fra dag 13-unger og voksne hanner undersøges for niveauet af thyreoideahormoner (T4) i serum. Der kan eventuelt foretages yderligere vurdering af T4 i blodprøver fra moderdyr og dag 4-unger. Andre hormoner kan eventuelt også måles. Blod fra unger til thyreoideahormonanalyse kan samles pr. kuld. Thyreoideahormoner (T4 og TSH) bør fortrinsvis måles som en samlet værdi.

57. Følgende urinanalyser kan eventuelt udføres på fem vilkårligt udvalgte hanner fra hver gruppe i undersøgelsens sidste uge til bestemmelse af udseende, volumen, osmolalitet eller relativ densitet, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

58. Endvidere kan det overvejes at gennemføre undersøgelser af serummarkører for generelle vævsskader. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis testkemikaliets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, phosphat, triglycerider og glukose ved faste, visse hormoner, methæmoglobin og cholinesterase. Disse forhold undersøges individuelt.

59. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer i hormonanalyserne:

— aflivningstidspunkt på grund af de forskellige hormonkoncentrationer i løbet af døgnet

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre fortolkningen vanskelig. På den anden side vil faste natten over kunne influere på (drægtige) dyrs almindelige stofskifte, forstyrre laktations- og plejeadfærden og – specielt i undersøgelser, hvor foderindtagelse står centralt – forstyrre den daglige eksponering for testkemikaliet. Hvis der fastes natten over, bør de klinisk-biokemiske bestemmelser for hanner foretages efter de funktionelle observationer i undersøgelsens fjerde uge. Moderdyrene bør holdes tilbage i yderligere én dag, efter at ungerne er blevet fjernet på f.eks. PND 13. Moderdyrene bør faste natten over fra laktationsdag 13-14, og blodet fra undersøgelsens afslutning anvendes til klinisk-kemiske parametre.

▼M8

— aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødig stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne

— analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

60. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på nogenlunde samme tidspunkt på dagen. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet.

61. Hvis ikke der foreligger passende historiske data, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk-biokemiske variabler, inden eksponering påbegyndes, eller så vidt muligt hos en gruppe dyr, der ikke er med i forsøgsgrupperne. Dataene for hunner skal komme fra lakterende dyr.

PATOLOGI

Makroskopisk undersøgelse

62. Alle voksne forsøgsdyr underkastes en fuldstændig og tilbundsgående makroskopisk undersøgelse, der omfatter omhyggelig undersøgelse af kroppens ydre, alle åbninger samt af kraniehule, brysthule og bughule og indholdet heraf. Særlig opmærksomhed bør rettes mod kønsorganerne. Antallet af implantationssteder bør registreres. Det vaginale smear bør undersøges på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af hunnernes kønsorganer.

63. På alle voksne handyr renses testikler og bitestikler samt prostata og vesiculae seminales og prostata anterior som én samlet enhed for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Derudover kan eventuelle organvejninger omfatte levator ani plus bulbocavernosus-muskelkomplekset, Cowpers kirtler og glans penis i hanner samt parrede ovarier (våd vægt) og uterus (herunder cervix) i hunner. Disse valgfrie vejninger bør foretages hurtigst muligt efter dissektion. Alle de voksne dyrs ovarier, testikler, bitestikler og sekundære kønsorganer samt alle organer, der udviser makroskopiske læsioner, præserveres.

64. Skjoldbruskkirtlerne fra alle voksne hanner og hunner samt fra én dag 13-hanunge og én dag 13-hununge fra hvert kuld præserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel med henblik på den påtænkte efterfølgende histopatologiske undersøgelse. Skjoldbruskkirtlens vægt kan bestemmes efter fiksering. Rensningen for vedhængende væv bør også foretages meget omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse. Der tages blodprøver fra et bestemt angivet sted umiddelbart inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning. Prøverne opbevares under egnede forhold (jf. punkt 56).

▼M8

65. Derudover befries lever, nyrer, binyrer, thymus, milt, hjerne og hjerte fra mindst fem voksne hanner og hunner, som udvælges vilkårligt fra hver gruppe (undtaget er de dyr, der er døende og/eller aflives, inden undersøgelsen er afsluttet), for alt vedhængende væv, og de vejes hurtigst muligt (våd vægt) efter dissektion, så udtørring undgås. Følgende væv bør præserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel både med hensyn til vævstype og den påtænkte efterfølgende histopatologiske undersøgelse: alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, øjne, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, luftrør og lunger (præserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), kønskirtler (testikler og ovarier), sekundære kønsorganer (uterus og cervix, bitestikler, prostataog vesiculae seminales plus prostata anterior), vagina, urinblære, lymfeknuder (ud over den nærmeste drænende lymfeknude bør en anden lymfeknude udtages på baggrund af laboratoriets erfaring (16)), perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, skeletmuskel og knogle med knoglemarv (knoglemarvssnit eller som alternativ et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). Det anbefales, at testikler fikseres ved immersion i Bouins væske eller modificeret Davidsons fikseringsmiddel (16) (17) (18). Fiksering med formalin anbefales ikke til disse væv. Tunica albuginea kan punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyle, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

66. Følgende væv kan give værdifulde indikationer på endokrinrelaterede virkninger: kønskirtler (testikler og ovarier), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, vesiculae seminales med prostata anterior, dorsolateral og ventral prostata), vagina, hypofyse, brystkirtler fra handyr og binyrer. Forandringer i brystkirtler fra handyr er ikke tilstrækkeligt dokumenteret, men denne parameter kan være meget følsom over for stoffer med østrogen virkemåde. Observation af organer/væv, der ikke er anført i punkt 65, er valgfrit.

67. Døde unger og unger, der aflives på dag 13 efter fødslen eller hurtigt derefter, bør som minimum undersøges omhyggeligt på kroppens ydre for større abnormiteter. Særlig opmærksomhed bør udvises over for de eksterne kønsorganer, som bør undersøges for tegn på forandringer i udviklingen.

Histopatologisk undersøgelse

68. Der bør foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af de præserverede organer og væv fra de udvalgte dyr i kontrolgruppen og højdosisgruppen (idet der lægges særlig vægt på spermatogenesens faser i hannernes kønskirtler og histopatologien i testiklernes interstitielle cellestruktur). Skjoldbruskkirtlerne fra ungerne og de resterende voksne dyr kan undersøges om nødvendigt. Disse undersøgelser bør omfatte dyr fra andre dosisgrupper, hvis der i højdosisgruppen observeres eksponeringsrelaterede ændringer. I vejledningen om histopatologi (10) findes der flere oplysninger om dissektion, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

69. Alle makroskopiske læsioner skal undersøges. Til fastsættelse af NOAEL'er bør målorganer fra andre dosisgrupper undersøges, navnlig fra grupper, der menes at udvise et NOAEL.

▼M8

70. Hvis der anvendes en satellitgruppe, bør der udføres en histopatologisk undersøgelse af væv og organer, der udviser toksisk virkning i behandlingsgrupperne.

DATA OG RAPPORTERING

Data

71. Der bør fremlægges data om hvert enkelt dyr. Derudover bør alle data sammenfattes i tabelform med angivelse for hver forsøgsgruppe af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under testen eller aflivet af humane grunde, tidspunkt for eventuel død eller aflivning, antal fertile dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de histopatologiske forandringer og alle relevante data om kuldene. Tillæg 3 indeholder en sammenfattende rapport i tabelform, der har vist sig at være særdeles velegnet til vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger.

72. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Sammenligninger af virkningen i et dosisinterval gør det muligt at undgå at bruge flere t-test. De statistiske metoder udvælges i forbindelse med undersøgelsens tilrettelæggelse. Statistiske analyser af AGD og bibeholdelse af brystvorter (»nipple retention«) bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til virkninger på de enkelte kuld. Når det er hensigtsmæssigt, er det kuldene, der er analyseenheden. Statistiske analyser af ungernes kropsvægt bør baseres på data fra de enkelte unger under hensyntagen til kuldstørrelsen. Som følge af undersøgelsens begrænsede omfang er de statistiske analyser i form af test for »signifikans« af begrænset værdi for mange endepunkter, især de reproduktionsrelaterede endepunkter. Nogle af de hyppigst anvendte metoder, især de parameterbaserede test for central tendens, er uegnede. Hvis der anvendes statistiske analyser, bør den valgte metode være egnet til fordeling af de undersøgte variabler og vælges, inden undersøgelsen indledes.

Vurdering af resultater

73. Resultaterne af denne toksicitetsundersøgelse bør vurderes med hensyn til de observerede virkninger samt obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng mellem dyrenes eksponering for testkemikaliet og tilstedeværelse eller fravær, forekomst og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske læsioner, identificerede målorganer, manglende fertilitet, unormale kliniske fund, påvirkning af reproduktions- og yngelpræstationer, ændringer af kropsvægt, indvirkning på mortaliteten og eventuelle andre toksiske virkninger.

74. På grund af hannernes korte behandlingsperiode bør histopatologien for testikler og bitestikler ses i sammenhæng med fertilitetsdataene ved vurdering af reproduktionsvirkningen på hannerne. Anvendelsen af historiske kontroldata om reproduktion/udvikling (f.eks. med hensyn til kuldstørrelse, AGD, bibeholdelse af brystvorter (»nipple retention«), T4-niveauer i serum) kan også, når sådanne foreligger, være en hjælp i forbindelse med fortolkningen af undersøgelsesresultaterne.

75. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at der beregnes variationskoefficienter for numeriske data, især for parametre med relation til påvisning af hormonforstyrrende virkninger. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske undersøgelser evalueres.

▼**M8**

Testrapport

76. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Eventuelt bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof, hvis dette ikke er vand.

Forsøgsdyr:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, foder mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse

— begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om formulering af testkemikalie eller iblanding heraf i foderet, opnået koncentration, foderblandingens stabilitet og homogenitet

— oplysninger om indgivelse af testkemikaliet

— eventuel omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af randomiseringsproceduren til eventuel udvælgelse af unger til fjernelse.

Resultater:

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

▼**M8**

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og andre tegn på toksicitet

— drægtighedsperiodens længde

— toksisk virkning eller andre virkninger på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ej)

— vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— antal voksne hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklus-varighed

— antal levendefødte og postimplantationstab

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter - makroskopisk vurdering af eksterne genitalia, antal små uudviklede unger

— dødstidspunkt under undersøgelsen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning

— antal implantationer, kuldstørrelse og kuldenes vægt på registreringstids-punktet

— data om ungernes kropsvægt

— AGD for alle unger (og kropsvægt på dagen for AGD-måling)

— bibeholdelse af brystvorter (»Nipple retention«) hos hanunger

— thyreoideahormonniveauer, dag 13-unger og voksne hanner (og eventuelt moderdyr og dag 4-unger)

— kropsvægt ved aflivning og organvægt for forældredyrene

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— absorptionsdata (hvis de foreligger)

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultater

Konklusioner

▼M8

Fortolkning af resultater

77. Ved denne undersøgelse vurderes den reproduktions-/udviklingsmæssige toksicitet i forbindelse med gentagen dosering. Da der lægges vægt på endepunkter for både generel toksicitet og reproduktions-/udviklingstoksicitet, vil resultaterne af undersøgelsen gøre det muligt at skelne mellem reproduktions-/udviklingsmæssige virkninger, som opstår uden generel toksicitet, og dem, der kun kommer til udtryk på niveauer, som også er toksiske for forældredyrene (jf. punkt 7-11). Den kan vise, om det er nødvendigt at foretage yderligere undersøgelser, og udstikke retningslinjer for udformningen af efterfølgende undersøgelser. Med hensyn til fortolkningen af de reproduktions- og udviklingsrelaterede resultater henvises til OECD's vejledende dokument 43 (19). OECD's vejledende dokument 106 om histologisk vurdering af endokrine og reproduktionsrelaterede test i gnavere (16) indeholder oplysninger om præpareringen og vurderingen af (endokrine) organer og vaginalt smear, der kan være nyttige i forbindelse med denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. og Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. og Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. og Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. og Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

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

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. og Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. og Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp og V.L. Reynolds. (1999). »Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights«, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER (SE OGSÅ (20) OECD GD 150)

Androgenicitet et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenicitet et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Udviklingstoksicitet manifestering af reproduktionstoksicitet, som repræsenterer prænatale, perinatale, postnatale, strukturelle eller funktionsmæssige forstyrrelser i afkommet.

Dosis: mængden af indgivet testkemikalie. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Dosering: et generelt udtryk, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Synlig toksicitet et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgivelse af testkemikaliet. Disse tegn bør være tilstrækkelige til farevurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udvikling af svære toksiske virkninger og sandsynligvis død.

Fertilitetsforringelse forstyrrelse af hanners eller hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Toksisk virkning på moderdyret skadelig virkning på drægtige hunner, der opstår enten specifikt (direkte virkning) eller ikke-specifikt (indirekte virkning), og som skyldes deres drægtighed.

NOAEL forkortelse for "no-observed-adverse-effect level" (niveau, hvor ingen skadelige virkninger observeres). Dette er det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede skadelige virkninger.

Østrogenicitet et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

Reproduktionstoksicitet fremkaldelse af skadelige virkninger på afkommet og/eller forringelse af hanners og hunners reproduktionsfunktioner eller -evne.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

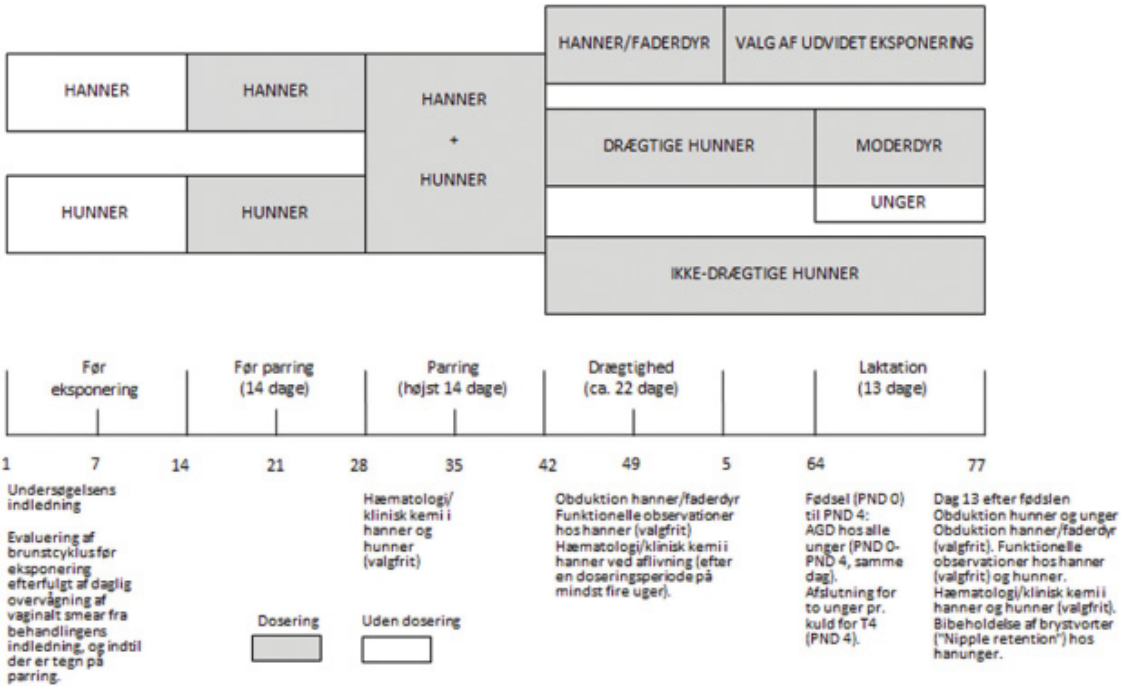
Thyreoid aktivitet et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T_3) i en pattedyrsorganisme.

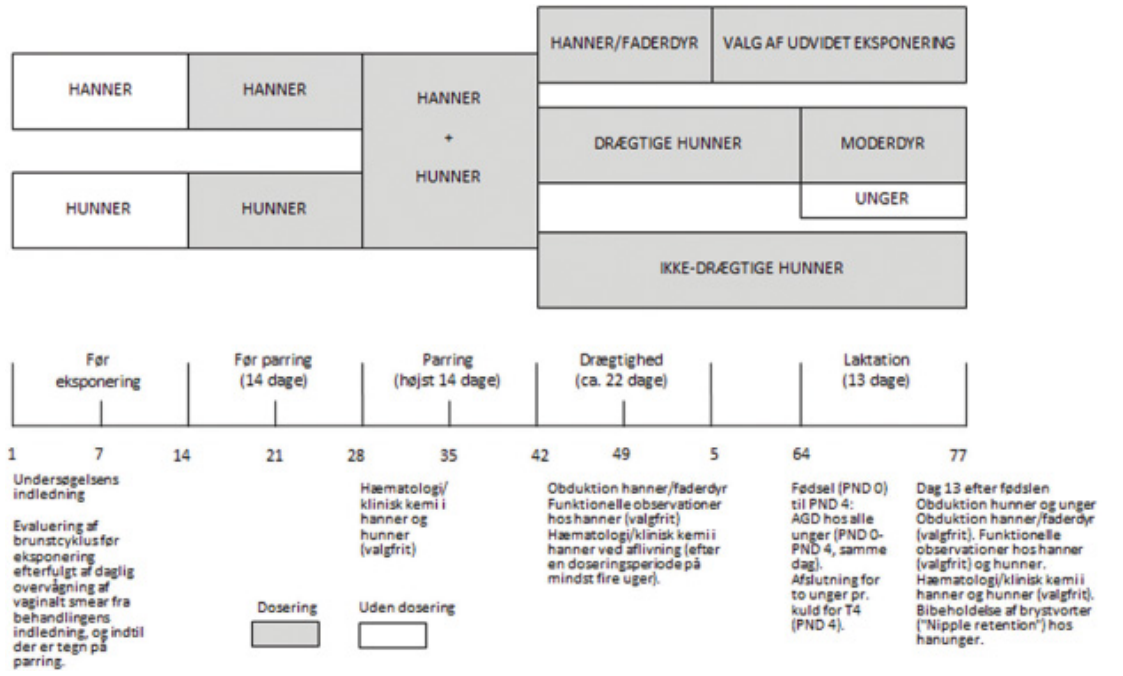
Validering en videnskabelig proces til karakterisering af en forsøgsmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvisning af dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

▼**M8**

Tillæg 2

DIAGRAM OVER FORSØGSPLANEN, SOM VISER DEN MAKSIMALE VARIGHED AF UNDERSØGELSEN BASERET PÅ EN FULD 14-DAGES PARRINGSPERIODE





▼**M8**

Tillæg 3

SAMMENFATTENDE RAPPORT I TABELFORM OVER REPRODUKTIONS-/UDVIKLINGSMÆSSIGE VIRKNINGER

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Dosering (enheder)	0 (kontrol)	…	…	…	…
Startede par (N)					
Brunstcyklus (som minimum gennemsnitlig varighed og frekvens for uregelmæssige cyklusser)					
Hunner, som viser tegn på kopulation (N)					
Hunner, som bliver drægtige (N)					
Undfangelse, dag 1-5 (N)					
Undfangelse, dag 6-… ([1]) (N)					
Drægtighed ≤ 21 dage (N)					
Drægtighed = 22 dage (N)					
Drægtighed ≥ 23 dage (N)					
Moderdyr med levende nyfødte unger (N)					
Moderdyr med levende unger på dag 4 efter fødslen (N)					
Implantater/moderdyr (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr ved fødslen (gennemsnit)					
Levende unger/moderdyr på dag 4 (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) ved fødslen (gennemsnit)					
Kønsfordeling (han/hun) på dag 4 (gennemsnit)					
Kuldenes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Kuldenes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ungernes vægt ved fødslen (gennemsnit)					
Ungernes vægt på tidspunktet for AGD-måling (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner)					
Ungernes AGD på den samme dag efter fødslen, fødsel - dag 4 (gennemsnit hanner, gennemsnit hunner, PND-angivelse)					
Ungernes vægt på dag 4 (gennemsnit)					
Ungernes vægt på dag 13 (gennemsnit)					

▼M8

OBSERVATIONER	VÆRDIER				
Hanungernes bibeholdelse af brystvorter ("nipple retention") på dag 13 (gennemsnit)					
UNGER MED ABNORMITETER					
Moderdyr med 0					
Moderdyr med 1					
Moderdyr med ≥ 2					
TAB AF AFKOM					
Prænatalt (implantationer minus levendefødte)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					
Postnatalt (levendefødte minus levende på dag 13 efter fødslen)					
Hunner med 0					
Hunner med 1					
Hunner med 2					
Hunner med ≥ 3					

([1]) sidste dag i parringsperioden

▼M8

B.65. *IN VITRO*-MEMBRANBARRIEREFORSØGSMETODE FOR HUDÆTSNING

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 435 (2015). Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, der viser sig som en synlig nekrose gennem epidermis til dermis efter påføring af et testkemikalie som defineret i De Forenede Nationers (FN's) globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU's) forordning 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]). Denne forsøgsmetode, som svarer til den opdaterede OECD-testvejledning 435, er en in vitro-membranbarriereforsøgsmetode, der kan anvendes til identifikation af ætsende kemikalier. I denne forsøgsmetode anvendes en kunstig membran, der reagerer på ætsende kemikalier på samme måde som dyrehud in situ.

2. Hudætsning er traditionelt blevet vurderet ved påføring af et testkemikalie på huden på levende dyr og vurdering af omfanget af vævsbeskadigelsen efter et bestemt tidsrum (2). Ud over denne forsøgsmetode er der blevet vedtaget flere andre in vitro-forsøgsmetoder som alternativer (3) (4) til den traditionelle in vivo-procedure med kaninhud (kapitel B.4 i dette bilag, som svarer til OECD TG 404), der anvendes til identifikation af ætsende kemikalier (2). Den trindelte UN GHS-test- og evalueringsstrategi for vurdering og klassificering af hudætsning og OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) vedrørende hudirritation/-ætsning anbefaler, at der anvendes validerede og accepterede in vitro-forsøgsmetoder under modul 3 og 4 (1) (5). IATA beskriver flere moduler, som grupperer informationskilder og analyseværktøjer, og vejleder i, i) hvordan eksisterende forsøgsdata og ikke-forsøgsdata integreres i og anvendes til vurdering af kemikaliers hudirritations-/hudætsningspotentiale, og ii) foreslår en tilgang, når der er behov for yderligere testning, herunder når der findes negative resultater (5). I denne modulopdelte tilgang kan positive resultater fra in vitro-forsøgsmetoder anvendes til at klassificere et kemikalie som ætsende uden dyreforsøg, hvorved anvendelsen af dyr reduceres, og det undgås at påføre dyrene de smerter og lidelser, de kan blive udsat for, når de anvendes til dette formål.

3. Der er foretaget valideringsundersøgelser af den in vitro-membranbarrieremodel, der findes i handelen under betegnelsen Corrositex® (6) (7) (8), som påviser en overordnet nøjagtighed for forudsigelse af hudætsning på 79 % (128/163), en følsomhed på 85 % (76/89) og en specificitet på 70 % (52/74) for en database med 163 stoffer og blandinger (7). På baggrund af denne anerkendte validitet er den validerede referencemetode (VRM) blevet anbefalet til at indgå som en del af en trindelt teststrategi til vurdering af kemikaliers potentielle hudætsningsfare (5) (7). Inden en in vitro-membranbarrieremodel til vurdering af hudætsning kan benyttes i lovgivningsøjemed, skal dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og grænserne for dens påtænkte anvendelse bestemmes for at sikre, at den er sammenlignelig med VRM'erne (9), i overensstemmelse med de foruddefinerede ydeevnestandarder (PS) (10). OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data vil først være garanteret, når en foreslået ny eller opdateret metode i

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1).

▼M8

henhold til ydeevnestandarderne er blevet gennemgået og medtaget i den tilsvarende OECD-testvejledning. For øjeblikket er kun en in vitro-metode omfattet af OECD-testvejledning 435 og denne forsøgsmetode, nemlig den Corrositex®-model, der findes i handelen.

4. Andre forsøgsmetoder til vurdering af hudætsning er baseret på anvendelse af rekonstitueret human hud (OECD TG 431) (3) og isoleret rottehud (OECD TG 430) (4). Denne testvejledning muliggør endvidere underopdeling af ætsende kemikalier i de tre UN GHS-underkategorier for ætsende virkning og de tre UN-transportemballagegrupper for ætsningsfare. Denne testvejledning blev oprindeligt vedtaget i 2006 og opdateret i 2015 for at referere til det vejledende IATA-dokument og opdatere listen over kompetencestoffer.

DEFINITIONER

5. De anvendte definitioner er forklaret i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

6. Den test, der beskrives i denne forsøgsmetode, muliggør identifikation af ætsende testkemikalier og underopdeling af ætsende testkemikalier i henhold til UN GHS/CLP (tabel 1). Derudover kan forsøgsmetoden anvendes til at træffe beslutninger om specifikke kemikalieklassers ætsende og ikke-ætsende virkning, f.eks. organiske og uorganiske syrer, syrederivater ([1]) og baser til visse transportrelaterede formål (7) (11) (12). Denne forsøgsmetode beskriver engenerisk procedure, der svarer til den validerede referencemetode (7). Forsøgsmetoden giver ikke fyldestgørende oplysninger om hudirritation, men det skal bemærkes, at TM B.46 (der svarer til OECD TG 439) specifikt vedrører in vitro-test af hudirritation (13). For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering bør OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering (IATA) følges (5).

Tabel 1

UN GHS-kategori og -underkategorier for hudætsning ([1])

Kategori for hudætsning (kategori 1) (for myndigheder, der ikke anvender underkategorier)	Underkategorier for hudætsning ([1]) (for myndigheder, der anvender underkategorier, herunder CLP-forordningen)	Ætsende i ≥ 1 af 3 dyr	
		Eksponering	Observation
Ætsende	Underkategori for ætsning 1A	≤ 3 minutter	≤ 1 time
	Underkategori for ætsning 1B	> 3 minutter/≤ 1 time	≤ 14 dage
	Underkategori for ætsning 1C	> 1 time/≤ 4 timer	≤ 14 dage

([1]) For EU anvendes i CLP-forordningen de tre underkategorier for hudætsning 1A, 1B og 1C.

7. En af den validerede referencemetodes begrænsninger (7) er, at mange ikke-ætsende kemikalier og nogle ætsende kemikalier muligvis ikke er kvalificeret til testning ud fra resultaterne af den indledende kompatibilitetstest (jf. punkt 13). Vandige kemikalier med en pH på mellem 4,5 og 8,5 er ofte ikke

([1]) »Syrederivater« er en ikke-specifik betegnelse for en kemikaliegruppe og defineres bredt som et kemikalie produceret af en syre enten direkte eller ved modifikation eller delvis substitution. Denne gruppe omfatter anhydrider, halogensyrer, salte og andre kemikalietyper.

▼M8

kvalificeret til testning. Ikke desto mindre var 85 % af de kemikalier, der blev testet i dette pH-interval, ikke ætsende ved dyreforsøg (7). In vitro-membranbarrieremetoden kan anvendes til testning af faste stoffer (vandopløselige eller uopløselige i vand), væsker (vandige eller ikke-vandige) og emulsioner. Testkemikalier, der ikke forårsager en påviselig ændring under kompatibilitetstesten (dvs. farveændring i kemikaliedetektionssystemet (CDS) i den validerede referenceforsøgsmetode), kan imidlertid ikke testes med membranbarrieremetoden og bør testes ved hjælp af andre forsøgsmetoder.

PRINCIP FOR TESTEN

8. Testsystemet består af to dele: en syntetisk makromolekylær biobarriere og et kemikaliedetektionssystem (CDS). Ved hjælp af CDS-membranbarrieren påviser denne forsøgsmetode skader forårsaget af ætsende testkemikalier efter påføring af et testkemikalie på overfladen af den syntetiske makromolekylære membranbarriere (7), idet disse skader formodes forårsaget af de samme ætsende mekanismer som dem, der opererer på levende hud.

9. Membranbarrierens penetration (eller gennembrud) kan måles ved en række procedurer eller CDS, herunder ændring af farven på en pH-indikatorfarve eller af en anden af indikatoropløsningens egenskaber under barrieren.

10. Det bør bestemmes, at membranbarrieren er gyldig, dvs. relevant og pålidelig, til det påtænkte formål. Dette indebærer sikring af, at forskellige kemiske produkter er homogene med hensyn til deres barriereegenskaber, f.eks. at de er i stand til at opretholde en barriere mod ikke-ætsende kemikalier, og at de kan kategorisere kemikaliernes ætsende egenskaber i henhold til de forskellige UN GHS-underkategorier for ætsning (1). Den tildelte klassificering baseres på den tid, det tager for et kemikalie at trænge igennem membranbarrieren og ind til indikatoropløsningen.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

11. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af in vitro-membranbarrieremetoden, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 12 anbefalede kompetencestoffer i tabel 2. I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er berettiget, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor (f.eks. fra listen over referencekemikalier (10)), forudsat at der benyttes de samme udvælgelseskriterier som beskrevet i tabel 1.

Tabel 2

Kompetencestoffer ([1])

Stof ([2])	CAS RN	Kemisk gruppe	UN GHS-underkategori in vivo ([3])	UN GHS-underkategori in vitro ([3])
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Uorganiske syrer	1A	1A
Salpetersyre	7697-37-2	Uorganiske syrer	1A	1A
Phosphorpentachlorid	10026-13-8	Prækursorer for uorganiske syrer	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Syrechlorider	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Uorganiske baser	1B	1B

▼M8

Stof ([2])	CAS RN	Kemisk gruppe	UN GHS-underkategori in vivo ([3])	UN GHS-underkategori in vitro ([3])
1-(2-aminoethyl)piperazin	140-31-8	Alifatiske aminer	1B	1B
Benzensulfonylchlorid	98-09-9	Syrechlorider	1C	1C
N,N-dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniliner	1C	1C
Tetraethylenpentamin	112-57-2	Alifatiske aminer	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Phenoler	NC	NC
Nonylacrylat	2664-55-3	Acrylater/methacrylater	NC	NC
Natriumbicarbonat	144-55-8	Uorganiske salte	NC	NC

([1]) De 12 ovennævnte stoffer indeholder tre stoffer fra hver af de tre UN GHS-underkategorier for ætsende stoffer og tre ikke-ætsende stoffer, og de kan købes på markedet. UN GHS-underkategorien er baseret på resultaterne af in vivo-testning af høj kvalitet. Stofferne er taget fra listen over 40 referencestoffer, der står opført på minimumslisten over kemikalier, som er identificeret med henblik på påvisning af nøjagtigheden og pålideligheden af forsøgsmetoder, der strukturelt og funktionelt ligner den validerede referenceforsøgsmetode, og som blev udvalgt blandt de 163 referencekemikalier, der oprindeligt blev anvendt til at validere referenceforsøgsmetoden (Corrositex®) (7) (10) (14). Formålet med denne udvælgelsesproces var i videst muligt omfang at medtage kemikalier, der var repræsentative for det responsinterval for ætsende virkning (f.eks. ikke-ætsende, ætsende i henhold til UN-emballagegruppe I, II og III), som den validerede referenceforsøgsmetode er i stand til at måle eller forudsige, var repræsentative for de kemiske grupper, der blev anvendt i valideringsprocessen, havde veldefinerede kemiske strukturer, gav reproducerbare resultater i den validerede referenceforsøgsmetode, gav definitive resultater i in vivo-referencetesten, fandtes i handelen og ikke var forbundet med uoverkommelige bortskaffelsesomkostninger (14).

([2]) Stoffer testet rene eller med en renhed på ≥ 90 %.

([3]) De tilsvarende UN-emballagegrupper er henholdsvis I, II og III for UN GHS-underkategori 1A, 1B og 1C. NC: ikke-ætsende.

FREMGANGSMÅDE

12. Nedenstående punkter beskriver de komponenter og procedurer, som en forsøgsmetode til vurdering af ætsende virkning med en kunstig membranbarriere består af (7) (15), baseret på den aktuelle VRM, dvs. Corrositex®, som findes i handelen. Membranbarrieren og kompatibilitets-/indikatoropløsningen og kategoriseringsopløsningen kan konstrueres, fremstilles eller købes i handelen, som det er tilfældet med VRM'en Corrositex®. Der findes et eksempel på en forsøgsmetodeprotokol for den validerede referenceforsøgsmetode (7). Testen bør foretages ved stuetemperatur (17-25 °C), og komponenterne skal opfylde nedenstående betingelser.

Testkemikalie-kompatibilitetstest

13. Inden membranbarrieretesten foretages, udføres en kompatibilitetstest for at fastslå, om CDS kan detektere testkemikaliet. Hvis ikke CDS kan detektere testkemikaliet, er membranbarrieretesten ikke egnet til at vurdere det pågældende testkemikalies potentielle ætsende virkning, og der anvendes en anden forsøgsmetode. CDS og eksponeringsforholdene i kompatibilitetstesten bør afspejle eksponeringen i den efterfølgende membranbarrieretest.

Tidsbestemt kategoritest for testkemikaliet

14. Hvis det passer til forsøgsmetoden, underkastes et testkemikalie, der er kvalificeret i henhold til kompatibilitetstesten, en tidsbestemt kategoritest, dvs. en screeningstest, for at skelne mellem svage og stærke syrer eller baser. I den validerede referenceforsøgsmetode anvendes f.eks. en tidsbestemt kategoriseringstest til at vise, hvilken af to tidsrammer der bør anvendes, alt efter om

▼M8

der påvises en signifikant sur eller basisk reserve. Der bør anvendes to forskellige tidsrammer for gennembrud til bestemmelse af den ætsende virkning og UN GHS-underkategorien for hudætsning på baggrund af testkemikaliets sure eller basiske reserve.

MEMBRANBARRIEREFORSØGSMETODENS KOMPONENTER

Membranbarriere

15. Membranbarrieren består af to komponenter: en proteinholdig makromolekylær vandig gel og en permeabel støttemembran. Den proteinholdige gel bør være uigennemtrængelig for væsker og faste stoffer, men kan ætses og gøres permeabel. Den fuldt konstruerede membranbarriere bør opbevares under forud fastsatte betingelser, som har vist sig at forhindre, at gelen ødelægges, f.eks. ved udtørring, bakterievækst, flytning, revnedannelse, der ville forringe dens ydeevne. Den acceptable opbevaringsperiode skal fastsættes, og membranbarrierepræparaterne må ikke anvendes efter udløbet af denne periode.

16. Den permeable støttemembran yder den proteinholdige gel mekanisk støtte under gelatineringsprocessen, og mens den eksponeres for testkemikaliet. Støttemembranen skal forhindre, at gelen synker sammen eller flytter sig, og alle testkemikalier skal kunne trænge igennem den.

17. Den proteinholdige gel, der består af protein, f.eks. keratin, collagen eller blandinger af proteiner, som danner en gelmatrice, er målet for testkemikaliet. Det proteinholdige materiale anbringes på støttemembranens overflade og gelatinerer, inden membranbarrieren placeres over indikatoropløsningen. Den proteinholdige gel skal have samme tykkelse og tæthed overalt og være uden luftbobler eller andre defekter, der risikerer at påvirke dens funktionelle integritet.

Kemikaliedetektionssystem (CDS)

18. Indikatoropløsningen, der er den samme opløsning som den, der bruges i kompatibilitetstesten, skal reagere på testkemikaliets tilstedeværelse. Der skal bruges en pH-indikatorfarve eller -farvekombination, f.eks. cresolrød og methylorange, der skifter farve som reaktion på testkemikaliets tilstedeværelse. Målesystemet kan være visuelt eller elektronisk.

19. Relevansen og pålideligheden af de detektionssystemer, der udvikles til detektion af testkemikaliets passering gennem barrieremembranen, skal vurderes for at påvise den række kemikalier, der kan detekteres, og de kvantitative begrænsninger for detektionen.

TESTENS YDEEVNE

Samling af forsøgsmetodens komponenter

20. Membranbarrieren anbringes i et hætteglas (eller rør), som indeholder indikatoropløsningen, således at hele støttemembranen er i kontakt med indikatoropløsningen, og der ikke er luftbobler til stede. Der bør udvises forsigtighed for at bevare barrierens integritet.

▼M8

Påføring af testkemikaliet

21. En passende mængde testkemikalie, f.eks. 500 µl, hvis der er tale om en væske, eller 500 mg fint pulver, hvis der er tale om et fast stof (7), påføres forsigtigt membranbarrierens opadvendte overflade og fordeles jævnt. Der forberedes et passende antal replikater, f.eks. fire (7), for hvert testkemikalie og deres tilhørende kontroller (jf. punkt 23-25). Tidspunktet for testkemikaliets påføring på membranbarrieren registreres. For at sikre, at korte ætsningstider bliver registreret nøjagtigt, anføres tidspunkterne for testkemikaliets indføring i de forskellige hætteglas separat.

Måling af membranbarrierepenetration

22. Hvert hætteglas overvåges nøje, og tidspunktet for den første ændring af indikatoropløsningen, dvs. barrierepenetration, registreres, og tiden mellem påføring på og penetration af membranbarrieren bestemmes.

Kontroller

23. I test, hvor der bruges et bærestof eller opløsningsmiddel sammen med testkemikaliet, bør bærestoffet eller opløsningsmidlet være kompatibelt med membranbarrieresystemet, dvs. det må ikke ændre membranbarrieresystemets integritet, og det må ikke ændre testkemikaliets ætsende virkning. Når det er relevant, bør der testes kontroller med opløsningsmiddel (eller bærestof) sideløbende med testkemikaliet for at påvise opløsningsmidlets kompatibilitet med membranbarrieresystemet.

24. En positiv (ætsende) kontrol med mellemhøj ætsende aktivitet, f.eks. 110 ± 15 mg natriumhydroxid (UN GHS-underkategori 1B) (7), bør testes sideløbende med testkemikaliet for at vurdere, om testsystemet fungerer, som det skal. Det kan være hensigtsmæssigt at teste en anden positiv kontrol fra samme kemiske gruppe som testkemikaliet med henblik på at evaluere et ætsende testkemikalies relative ætsende potentiale. Der bør vælges positive kontroller med mellemkraftig ætsende virkning (f.eks. UN GHS-underkategori 1B) med henblik på at påvise ændringer i penetrationstiden, der kan være uacceptabelt meget længere eller kortere end den fastsatte referenceværdi og dermed viser, at testsystemet ikke fungerer korrekt. I denne forbindelse er stærkt ætsende (UN GHS-underkategori 1A) og ikke-ætsende kemikalier af begrænset relevans. Et ætsende kemikalie fra UN GHS-underkategori 1B ville påvise en for kort eller lang gennembrudstid. Et svagt ætsende kemikalie (UN GHS-underkategori 1C) kan eventuelt benyttes som positiv kontrol til at måle forsøgsmetodens evne til konsekvent at skelne mellem svagt ætsende og ikke-ætsende kemikalier. Uanset den anvendte tilgang skal der opstilles et acceptabelt responsinterval for positive kontroller med udgangspunkt i det historiske interval for de anvendte positive kontrollers gennembrudstider, som f.eks. gennemsnit ± 2-3 standardafvigelser. I hver undersøgelse skal den præcise gennembrudstid for den positive kontrol bestemmes, så afvigelser, der ligger uden for det acceptable interval, kan påvises.

25. Der bør endvidere testes en negativ (ikke-ætsende) kontrol, f.eks. 10 % citronsyre, 6 % propionsyre (7), sideløbende med testkemikaliet som en anden kvalitetskontrolforanstaltning til påvisning af membranbarrierens funktionelle integritet.

▼M8

Acceptkriterier for undersøgelsen

26. I henhold til de opstillede tidsparametre for de enkelte UN GHS-underkategorier for ætsende virkning anvendes den tid (i minutter), der går mellem et testkemikalies påføring på membranbarrieren og barrierepenetrationen, til at forudsige testkemikaliets ætsende virkning. For at en undersøgelse kan opfattes som acceptabel, skal den sideløbende positive kontrol give den forventede penetrationsresponstid (f.eks. 8-16 minutters gennembrudstid for natriumhydroxid, hvis dette stof anvendes som positiv kontrol), den sideløbende negative kontrol skal være ikke-ætsende, og en eventuel kontrol med opløsningsmiddel skal hverken være ætsende eller ændre testkemikaliets ætsende potentiale. Inden laboratorierne påbegynder rutinemæssig brug af en metode, som er i overensstemmelse med denne forsøgsmetode, skal de påvise deres tekniske kompetence ved hjælp af de 12 anbefalede stoffer i tabel 2. Inden nye analoge metoder, der udvikles under denne forsøgsmetode, og som strukturelt og funktionelt ligner den validerede referencemetode (14), tages i brug til testning i lovgivningsøjemed, bør de foruddefinerede ydeevnestandarder bruges til at påvise den nye metodes pålidelighed og nøjagtighed.

Fortolkning af resultater og testkemikaliernes klassificering efter ætsende virkning

27. Den tid (i minutter), der går mellem testkemikaliets påføring på membranbarrieren og barrierepenetrationen, bruges til at klassificere testkemikaliet i UN GHS-underkategorierne for ætsende virkning (1) og eventuelt i UN-emballagegrupperne (16). De tidsmæssige afskæringsværdier for de tre underkategorier for ætsende virkning opstilles for hver enkelt foreslået forsøgsmetode. De endelige beslutninger om afskæringstider bør tage hensyn til behovet for at minimere underklassificering af ætsningsfare (dvs. falske negative). I denne testvejledning bør afskæringstiderne for Corrositex®, som beskrevet i tabel 3, anvendes, da denne er den eneste forsøgsmetode, der for øjeblikket er omfattet af denne testvejledning (7).

Tabel 3

Corrositex®-forudsigelsesmodel

Gennemsnitlig gennembrudstid (min.)		UN GHS-forudsigelse (3)
Kategori 1-testkemikalier (1) (bestemt ved metodens kategoriseringstest)	Kategori 2-testkemikalier (2) (bestemt ved metodens kategoriseringstest)	
0-3 min.	0-3 min.	Ætsende valgfri underkategori 1A
> 3 til 60 min.	> 3 til 30 min.	Ætsende valgfri underkategori 1B
> 60 til 240 min.	> 30 til 60 min.	Ætsende valgfri underkategori 1C
> 240 min.	> 60 min.	Ikke-ætsende

(1) Testkemikalier med høj sur/basisk reserve (6).
(2) Testkemikalier med lav sur/basisk reserve (6).
(3) UN GHS-underkategori 1A, 1B og 1C svarer til henholdsvis UN-emballagegruppe I, II og III.

▼**M8**

DATA OG RAPPORTERING

Data

28. Den tid (i minutter), der går mellem påføring og barrierepenetration for henholdsvis testkemikaliet og den eller de positive kontroller, rapporteres i tabelform som individuelle replikatdata sammen med gennemsnit ± standardafvigelsen for hvert forsøg.

Testrapport

29. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer:

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— oprindelse, evt. batchnummer

— behandling af testkemikaliet/kontrolstoffet inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling)

— testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis dette er kendt

— opbevaringsforhold.

Bærestof:

— identifikation, koncentration (hvis relevant), anvendt mængde

— begrundelse for valg af bærestof.

Anvendt in vitro-membranbarrieremodel og -protokol, herunder påvist nøjagtighed og pålidelighed

Testbetingelser:

— beskrivelse af anvendt apparatur og anvendte præpareringsprocedurer

— den anvendte in vitro-membranbarrieres oprindelse og sammensætning

— indikatoropløsningens sammensætning og egenskaber

— detektionsmetode

— testkemikalie- og kontrolstofmængde

— antal replikater

— beskrivelse af og begrundelse for den tidsbestemte kategoriseringstest

▼**M8**

— påføringsmetode

— observationstidspunkter

— beskrivelse af de benyttede vurderings- og klassificeringskriterier

— påvisning af kompetence til at anvende forsøgsmetoden inden rutinemæssig brug ved at teste kompetencekemikalierne.

Resultater:

— opstilling i tabelform af individuelle rådata fra individuelle test og kontroller for hvert replikat

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.

(3) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis (RhE).

(4) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: Transkutan elektrisk modstand (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. og Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495).

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. og Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitel B.46 i dette bilag, In vitro-hudirritation: forsøgsmetode med rekonstrueret human epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Tilgængelig på: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Tilgængelig på: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (9).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Kemikaliedetektionssystem (CDS): et visuelt eller elektronisk målesystem med en indikatoropløsning, der reagerer på et testkemikalies tilstedeværelse, f.eks. ved ændring af en pH-indikatorfarve eller -farvekombination. Systemet reagerer på testkemikaliets tilstedeværelse med en farveændring eller med en anden form for kemisk eller elektrokemisk reaktion.

Konkordans: et mål for ydeevnen af en forsøgsmetode, der fører til kategoriske resultater, og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes af og til som synonym for nøjagtighed og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. Konkordansen afhænger i høj grad af forekomsten af positiver i de undersøgte typer testkemikalier (9).

GHS (det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

IATA: integreret tilgang til testning og vurdering.

Blanding: blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med flere bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

NC: Ikke-ætsende.

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. Disse standarder omfatter i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og iii) de tilsvarende niveauer af pålidelighed og nøjagtighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (9).

▼**M8**

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem forsøgsmetoden og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang forsøgsmetoden måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (9).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (9).

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

In vivo-hudætsning: fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs. synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter påføring af et testkemikalie i indtil fire timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Den er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (9).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M8

B.66. STABILT TRANSFEKTEREDE *IN VITRO*-TRANSAKTIVERINGSASSAYS TIL PÅVISNING AF ØSTROGENRECEPTORAGONISTER OG -ANTAGONISTER

GENEREL INDLEDNING

OECD's ydeevnebaserede testvejledning

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 455 (2016). TG 455 er en ydeevnebaseret testvejledning (PBTG), der beskriver metoden for stabilt transfekterede in vitro-transaktiveringsassays til påvisning af østrogenreceptoragonister og -antagonister (ER TA-assays). Den omfatter flere mekanistisk og funktionelt tilsvarende forsøgsmetoder til identifikation af østrogenreceptoragonister og -antagonister (dvs. ERα og/eller ERβ) og ventes at lette udviklingen af nye lignende eller modificerede forsøgsmetoder i overensstemmelse med de principper for validering, som er fastsat i OECD's vejledende dokument om validering og international accept af nye eller opdaterede forsøgsmetoder til farevurdering (1). De fuldt validerede referenceforsøgsmetoder (tillæg 2 og tillæg 3), som danner grundlag for denne PBTG, er:

   — det stabilt transfekterede TA-assay (STTA) (2), som bruger (h) ERα-HeLa-9903-cellelinjen, og

   — VM7Luc ER TA-assayet (3), som anvender VM7Luc4E2-cellelinjen ([1]), der overvejende angiver hERα med en vis medvirken fra hERβ(4) (5).

   Der findes ydeevnestandarder (PS) (6) (7), som bør anvendes til udvikling og validering af lignende assays vedrørende den samme fareegenskab. De gør det muligt rettidigt at ændre PBTG 455, så nye lignende assays kan blive tilføjet den opdaterede PBTG. Lignende assays vil dog først blive tilføjet efter OECD's kontrol og validering af, at ydeevnestandarderne er opfyldt. De assays, der er omfattet af TG 455, kan uden forskel anvendes til at opfylde OECD-medlemslandenes krav til testresultaterne om østrogenreceptortransaktivering, samtidig med at de drager fordel af OECD-aftalen om gensidig anerkendelse af data.

Baggrund og principper for de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode

2. OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet med henblik på revision af eksisterende og udvikling af nye testvejledninger vedrørende screening og testning af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's begrebsramme

([1]) Frem til juni 2016 blev denne cellelinje betegnet som BG1Luc-cellelinjen. BG-1-celler blev oprindelig beskrevet af Geisinger m.fl. (1998) (35) og blev senere karakteriseret af forskere ved National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). For relativt kort tid siden opdagede man, at der findes to varianter af BG-1-celler, som anvendes af forskere, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Tilbundsgående analyser, herunder DNA-test, af disse to BG-1-variantcellelinjer udført af Li og medarbejdere (2014) (37), viste, at BG-1 Fr var unik, og at BG-1 NIEHS, dvs. den oprindelige cellelinje, der blev anvendt til at udvikle assayet, ikke var den humane BG1-ovariale carcinomcellelinje, men i stedet var en variant af den humane MCF7-brystcancercellelinje. Den cellelinje, som anvendes i assayet, og som oprindelig blev kaldt BG1Luc4E2 (38), vil nu blive betegnet VM7Luc4E2 (»V« = variant, »M7« = MCF7-celler). På samme måde vil assayet nu blive betegnet VM7Luc ER TA. Selv om dette ændrer oprindelsen af den cellelinje, assayet bygger på, påvirker det ikke offentliggjorte valideringsundersøgelser eller nytteværdien og anvendelsen af dette assay til screening af østrogene/antiøstrogene kemikalier.

▼**M8**

for testning og vurdering af potentielle hormonforstyrrende kemikalier blev revideret i 2012. Den oprindelige og reviderede begrebsramme er vedlagt som bilag til OECD's vejledende dokument om standardiserede testvejledninger til vurdering af kemikaliers hormonforstyrrende virkning (8). Begrebsrammen omfatter fem niveauer, idet hvert niveau svarer til et niveau for biologisk kompleksitet. De ER-transaktiveringsassays (ER TA-assays), som beskrives i denne forsøgsmetode, tilhører niveau 2, der omfatter *»in vitro-assays, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje«*. Denne forsøgsmetode er til in vitro-transaktiveringsassays (TA-assays), som er beregnet til at påvise østrogenreceptoragonister og -antagonister.

3. Østrogeners interaktion med ER'er kan påvirke transkriptionen af østrogenkontrollerede gener, hvilket kan føre til induktion eller inhibering af cellulære processer, herunder processer, som er nødvendige for celleproliferation, normal fosterudvikling og reproduktiv funktion (9) (10) (11). Forstyrrelse af normale østrogensystemer kan potentielt udløse skadelige virkninger på normal udvikling (ontogenese), reproduktiv sundhed og det reproduktive systems integritet.

4. In vitro-transaktiveringsassays er baseret på stoffernes direkte eller indirekte interaktion med en specifik receptor, som regulerer transkriptionen af et reportergenprodukt. Sådanne assays er i stor udstrækning blevet anvendt til at vurdere genekspression, der reguleres af specifikke kernereceptorer som f.eks. ER'er (12) (13) (14) (15) (16). De er blevet foreslået til påvisning af østrogentransaktivering, som reguleres af ER'en (17) (18) (19). Der findes mindst to større undertyper af kerne-ER'er, α og β, som er kodet af forskellige gener. De respektive proteiner har forskellige biologiske funktioner og forskellig vævsfordeling og ligandaffinitet (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Kerne-ERα medierer den klassiske østrogenrespons (27) (28) (29) (30), og derfor er de fleste af de modeller, der for øjeblikket udvikles til at måle ER-aktivering eller -inhibering, ERα-specifikke. Disse assays anvendes til påvisning af kemikalier, deraktiverer (eller inhiberer) ER'en efter ligandbinding, hvorefter receptor-ligand-komplekset binder sig til specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et reportergen, hvilket resulterer i et markørproteins øgede celleekspression. Der kan anvendes forskellige reporterresponser i disse assays. I luciferasebaserede systemer omdanner luciferaseenzymet luciferinmediet til et bioluminescensprodukt, som måles kvantitativt med et luminometer. Andre eksempler på almindelige reportere er fluorescerende protein og *LacZ*-genet, som koder β-galactosidase, et enzym, der kan omdanne det farveløse medium X-gal (5-brom-4-chlor-indolyl-galactopyranosid) til et blåt produkt, der kan kvantificeres med et spektrofotometer. Disse reportere kan vurderes hurtigt og billigt med analysesæt, der kan fås i handelen.

5. Valideringsundersøgelser af STTA- og VM7Luc TA-assays har påvist deres relevans og pålidelighed i overensstemmelse med deres formål (3) (4) (5) (30). Ydeevnestandarder for luminescensbaserede ER TA-assays ved anvendelse af brystcellelinjer er omfattet af ICCVAM-evalueringsrapporten Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Disse ydeevnestandarder er blevet ændret, så de kan anvendes på både STTA- og VM7Luc TA-assays (2).

6. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

▼M8

Anvendelsesområde og begrænsninger i forbindelse med TA-assays

7. Disse assays foreslås til screenings- og prioriteringsformål, men kan også give mekanistiske oplysninger, som kan anvendes i en weight-of-the-evidence-analyse. De analyserer den TA, som kemikaliets binding til ER'ene inducerer i et in vitro-system. Resultaterne bør således ikke direkte ekstrapoleres til den komplekse signalering og regulering af det intakte hormonsystem in vivo.

8. TA'en, som medieres af ER'ene, betragtes som en af de centrale mekanismer ved hormonforstyrrelse (ED), skønt der findes andre mekanismer, gennem hvilke ED kan forekomme, bl.a. i) interaktioner med andre receptorer og enzymsystemer i hormonsystemet, ii) hormonsyntese, iii) metabolisk aktivering og/eller inaktivering af hormoner, iv) fordeling af hormoner til målvæv og v) clearance af hormoner fra kroppen. Ingen af de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, behandler disse virkemåder.

9. Denne forsøgsmetode ser på kemikaliers evne til at aktivere (dvs. handle som agonister) og undertrykke (dvs. handle som antagonister) ER-afhængig transkription. Nogle kemikalier kan udvise både celletypeafhængig agonist- og antagonistaktivitet og er kendt som selektive østrogenreceptormodulatorer (SERM'er). Kemikalier, der er negative i disse assays, kan vurderes i en ER-bindingsassay, før det konkluderes, at kemikaliet ikke binder sig til receptoren. Desuden vil disse assays formentlig kun oplyse om forældremolekylets aktivitet, da in vitro-cellesystemerne har begrænset metaboliserende kapacitet. I betragtning af at der kun blev anvendt enkeltstoffer under valideringen, er anvendeligheden på forsøgsblandinger ikke blevet behandlet. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teoretisk set benyttes til testning af stoffer med flere bestanddele, UVCB'er og blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes på et stof med flere bestanddele, et UVCB eller en blanding til generering af data i lovgivningsøjemed, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

10. Til orientering viser tabel 1 agonist-testresultaterne for de 34 stoffer, som blev testet i de to fuldt validerede referenceforsøgsmetoder, der beskrives i denne forsøgsmetode. Af disse stoffer er 26 klassificeret som definitive ER-agonister og otte som negative baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-binding og TA og/eller det uterotrofiske assay (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabel 2 viser antagonist-testresultaterne for de 15 stoffer, som blev testet i de to fuldt validerede referenceforsøgsmetoder, der beskrives i denne forsøgsmetode. Af disse stoffer er fire klassificeret som definitive/formodede ER-antagonister og 10 som negative baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-binding og TA (2) (3) (18) (31). Med henvisning til dataene i tabel 1 og 2 var der 100 % overensstemmelse mellem de to referenceforsøgsmetoder med hensyn til klassificeringen af samtlige stoffer med undtagelse af ét stof (mifepriston) i antagonistassayet, og samtlige stoffer blev klassificeret korrekt som ER-agonister/-antagonister eller negative. Der findes yderligere oplysninger om denne kemikaliegruppe samt om supplerende kemikalier, som er testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays i løbet af valideringsundersøgelserne, i ydeevnestandarderne for ER TA (6) (7), tillæg 2 (tabel 1, 2 og 3).

▼M8

Tabel 1

Oversigt over resultaterne af STTA- og VM7Luc ER TA-assays for stoffer testet i begge agonistassays og klassificeret som ER-agonister (POS) eller negative (NEG)

	Stof	CAS RN	STTA-assay (1)			VM7Luc ER TA-assay (2)		Datakilde til klassificering (4)		
			ER TA- aktivitet	PC_{10}-værdi (M)	PC_{50}-værdi (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-værdi (b), (3) (M)	Andre ER TA'er (c)	ER-binding	Uterotrofisk
1	17ß-østradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS(227/227)	POS	POS
2	17α-østradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-ethinyløstradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS(2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-cumylphenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*tert*-octylphenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG(30/30)	NEG	NT
10	Bisphenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisphenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylphthalat (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG

▼M8

	Stof	CAS RN	STTA-assay (1)			VM7Luc ER TA-assay (2)		Datakilde til klassificering (4)		
			ER TA- aktivitet	PC_{10}-værdi (M)	PC_{50}-værdi (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-værdi (b), (3) (M)	Andre ER TA'er (c)	ER-binding	Uterotrofisk
13	Corticosteron (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Coumestrol (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzein (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol (a)	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylphthalat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ingen PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Østron (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol (a)	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Chlordecon (a)	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG(8/8)	NEG	NT
26	*meso*-hexestrol (a)	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron (a)	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT

▼M8

	Stof	CAS RN	STTA-assay (1)			VM7Luc ER TA-assay (2)		Datakilde til klassificering (4)		
			ER TA- aktivitet	PC_{10}-værdi (M)	PC_{50}-værdi (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-værdi (b), (3) (M)	Andre ER TA'er (c)	ER-binding	Uterotrofisk
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Norethynodrel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	*p,p*'-Methoxychlor (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ingen PC_{50})b (a)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Phenobarbital (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolacton (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; EC_{50} = halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; POS = positiv; NT = ikke testet; PC_{10} (og PC_{50}) = koncentrationen af et teststof, ved hvilken responsen er 10 % (eller 50 % for PC_{50}) af den respons, der fremkaldes af den positive kontrol (E2, 1nM), på hver plade.

(a) Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, som blev kategoriseret som ER-agonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, Table 4-1 (3)).

(b) Den maksimale koncentration, der blev testet uden begrænsninger som følge af cytotoksisk effekt eller uopløselighed, var 1×10^{-5} M (STTA-assay) og 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA-assay).

(c) Tallet i parentes viser de testresultater, der blev klassificeret som positive (POS) eller negative (NEG), divideret med det samlede antal registrerede undersøgelser.

(1) Værdier oplyst i Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2).

(2) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(3) De gennemsnitlige EC_{50}-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

(4) Klassificeringen som ER-agonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Noter: Ikke alle assays inden for denne forsøgsmetode har de samme målinger. I nogle situationer er det ikke muligt at beregne EC_{50}, da der ikke genereres en fuldstændig dosis/respons-kurve. I STTA-assayet er PC_{10}-værdien den centrale måling, men der kan også være andre eksempler, hvor en PCx vil give nyttige oplysninger.

▼M8

Tabel 2

Sammenligning af resultater af STTA- og VM7Luc ER TA-assays for stoffer testet i begge antagonistassays og klassificeret som ER-antagonister (POS) eller negative (NEG)

	Stof ([a])	CAS RN	ER STTA-assay ([1])		VM7Luc ER TA-assay ([2])		ER STTA-kandidat-virkninger ([4])	ICCVAM ([5]) konsensusklassifika-tion	MeSH ([6]) kemisk gruppe	Produktgruppe ([7])
			ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]) (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
2	Dibenzo[a.h]anthracen	53-70-3	POS	Ingen IC_{50}	POS	Ingen IC_{50}	POS	PP	Polycyklisk forbindelse	Laboratoriekemi-kalie, naturpro-dukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	let POS	NEG	Steroid	Farmaceutisk produkt
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
6	17β-østradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Farmaceutisk produkt, vete-rinær

▼M8

	Stof ([a])	CAS RN	ER STTA-assay ([1])		VM7Luc ER TA-assay ([2])		ER STTA-kandidat-virkninger ([4])	ICCVAM ([5]) konsensusklassifika-tion	MeSH ([6]) kemisk gruppe	Produktgruppe ([7])
			ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]) (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyklisk forbindelse	Farvestof, natur-produkt, farma-ceutisk mellem-produkt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyklisk forbindelse	Herbicid
9	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, phthalsyre	Kosmetisk ingre-diens, industrike-mikalie, blødgø-ringsmiddel
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ikke testet	PN	Heterocyklisk forbindelse, pyri-midin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, hete-rocyklisk forbin-delse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Farmaceutisk produkt, vete-rinær
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, hete-rocyklisk forbin-delse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt

▼M8

	Stof ([a])	CAS RN	ER STTA-assay ([1])		VM7Luc ER TA-assay ([2])		ER STTA-kandidat-virkninger ([4])	ICCVAM ([5]) konsensusklassifika-tion	MeSH ([6]) kemisk gruppe	Produktgruppe ([7])
			ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]) (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50}-værdi ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ikke testet	NEG	Phenol	Kemisk mellem-produkt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Kulbrinte (cyklisk)	Naturprodukt

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; IC_{50} = halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; PN = formodet negativ; POS = positiv; PP = formodet positiv.

([a]) Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, som blev kategoriseret som ER-antagonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (2) (3).

([b]) Den maksimale koncentration, der blev testet uden begrænsninger som følge af cytotoksisk effekt eller uopløselighed, var 1×10^{-3} M (STTA-assay) og 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA-assay).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) De gennemsnitlige IC_{50}-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

([4]) ER STTA-aktivitet antaget ud fra deres indberettede virkninger kendt fra de historiske data om ER-receptorbinding i CERI-assayet, det uterotrofiske assay og oplysninger fra åben litteratur (2).

([5]) Klassificeringen som ER-antagonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31).

([6]) Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (tilgængelig på: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER

De centrale dele af assayets komponenter

11. Denne forsøgsmetode gælder for assays, hvor der anvendes en stabilt transfekteret eller endogen ERα-receptor og en stabilt transfekteret reportergenkonstruktion ved kontrol af et eller flere østrogenresponselementer. Andre receptorer såsom ERβ kan dog være til stede. Dette er de centrale dele af assayets komponenter.

Kontroller

12. Grundlaget for de foreslåede sideløbende referencestandarder for de forskellige agonist- og antagonistassays beskrives. Eventuelle sideløbende kontroller (negative, opløsningsmiddel og positive) er et tegn på, at assayet virker under testbetingelserne og danner grundlag for sammenligninger mellem forsøgene. De indgår normalt i acceptkriterierne for et givet forsøg (1).

Standardprocedurer for kvalitetskontrol

13. Standardprocedurer for kvalitetskontrol udføres som beskrevet for hvert assay for at sikre, at cellelinjen forbliver stabil gennem mange passeringer, forbliver mykoplasmafri (dvs. fri for kontaminering med bakterier) og bevarer evnen til at give de forventede ER-medierede responser over tid. Cellelinjerne kontrolleres desuden for korrekt identitet samt for andre kontaminanter (f.eks. svamp, gær og vira).

Påvisning af laboratoriets kompetence

14. Inden laboratorierne tester ukendte kemikalier med et assay under denne forsøgsmetode, skal de påvise deres kompetence med anvendelsen af det pågældende assay. Til påvisning af denne kompetence skal laboratorierne teste de 14 kompetencestoffer, der er anført i tabel 3 (agonistassayet), og de 10 kompetencestoffer, der er anført i tabel 4 (antagonistassayet). Denne kompetencetest vil endvidere bekræfte testsystemets responsivitet. Listen over kompetencestoffer indeholder en del af de referencestoffer, der er anført i ydeevnestandarderne for ER TA-assays (6). Disse stoffer findes i handelen, repræsenterer kemiske grupper, der sædvanligvis er forbundet med ER-agonist- eller -antagonistaktivitet, udviser et passende styrkeinterval, som forventes for ER-agonister/-antagonister (dvs. stærk til svag) og omfatter negative. Testen af kompetencestofferne bør gentages mindst to gange på forskellige dage. Kompetence påvises ved korrekt klassificering (positiv/negativ) af hvert kompetencestof. Kompetencetesten gentages af de enkelte teknikere, når de lærer et nyt assay. Alt efter celletype kan nogle af disse kompetencestoffer opføre sig som SERM'er og udvise aktivitet som både agonister og antagonister. Kompetencestofferne klassificeres imidlertid i tabel 3 og 4 efter deres kendte primære aktivitet, som skal anvendes til kompetencevurdering.

15. Til påvisning af laboratoriernes ydeevne og med henblik på kvalitetskontrol udarbejder de historiske databaser over agonister og antagonister med oplysninger om referencestandarder (f.eks. 17β-østradiol og tamoxifen), positive og negative kontrolkemikalier og kontrol med opløsningsmiddel (f.eks. DMSO). Indledningsvis genereres databasen ud fra mindst 10 uafhængige agonistanalyseserier (f.eks. 17β-østradiol) og 10 uafhængige antagonistanalyseserier (f.eks. tamoxifen). Laboratoriet tilføjer resultaterne fra fremtidige analyser af disse referencestandarder og kontroller med opløsningsmiddel for at øge databasen og sikre bioassayets konsekvens og ydeevne over tid.

▼M8

Tabel 3

Liste over (14) kompetencestoffer til agonistassay (1)

Nr. (8)	Stof	CAS RN	Forventet respons (2)	STTA-assay			VM7Luc ER TA-assay		MeSH-kemikaliegruppe (6)	Produktgruppe (7)
				PC_{10}-værdi (M) (3)	PC_{50}-værdi (M) (3)	Testkoncentrationsinterval (M)	VM7Luc EC_{50}-værdi (M) (4)	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) (5)		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt, veterinær
12	17α-østradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
15	*meso*-hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
11	4-*tert*-octylphenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Phenol	Kemisk mellemprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
6	Bisphenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Phenol	Kemisk mellemprodukt

▼M8

Nr. ([8])	Stof	CAS RN	Forventet respons ([2])	STTA-assay			VM7Luc ER TA-assay		MeSH-kemikaliegruppe ([6])	Produktgruppe ([7])
				PC_{10}-værdi (M) ([3])	PC_{50}-værdi (M) ([3])	Testkoncentrationsinterval (M)	VM7Luc EC_{50}-værdi (M) ([4])	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) ([5])		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt
3	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Carboxylsyre, ester, phthalsyre	Blødgøringsmiddel, industrikemikalie
4	*p,p*'-methoxychlor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Kulbrinte (halogeneret)	Pesticid, veterinær
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Carboxylsyre, phenol	Farmaceutisk produkt, konserveringsmiddel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyklisk forbindelse	Herbicid
20	Spironolacton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lacton, steroid	Farmaceutisk produkt
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyklisk forbindelse	Farmaceutisk produkt

▼M8

Nr. ([8])	Stof	CAS RN	Forventet respons ([2])	STTA-assay			VM7Luc ER TA-assay		MeSH-kemikali-egruppe ([6])	Produktgruppe ([7])
				PC_{10}-værdi (M) ([3])	PC_{50}-værdi (M) ([3])	Testkoncentration-sinterval (M)	VM7Luc EC_{50}-værdi (M) ([4])	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) ([5])		
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyklisk forbindelse, indol	Farmaceutisk produkt, veterinær

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; EC_{50} = halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; POS = positiv; PC_{10} (og PC_{50}) = koncentrationen af et teststof, ved hvilken responsen er 10 % (eller 50 % for PC_{50}) af den respons, der fremkaldes af den positive kontrol (E2, 1nM), på hver plade.

([1]) Klassificeringen som positiv eller negativ for ER-agonistaktivitet er baseret på ICCVAM's Background Review Documents (BRD) om ER-bindings- og TA-assays (31) samt empiriske data og andre oplysninger fra registrerede undersøgelser, der er offentliggjort og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Værdier oplyst i Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).

([3]) De gennemsnitlige EC_{50}-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

([4]) De indberettede koncentrationer var de højeste testede koncentrationer (bestemmelse af dosisinterval) under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet. Hvis laboratoriernes koncentrationer var forskellige, er den højeste koncentration angivet. Se tabel 4-10 i ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (tilgængelig på: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

([7]) Fra tabel 1 (liste over referencekemikalier (22) til vurdering af ER-agonistnøjagtighed) i ydeevnestandarderne (6).

([8]) Hvis et kompetencestof ikke længere findes i handelen, kan der anvendes et stof med den samme klassificering og sammenlignelig styrke, virkemåde og kemisk sammensætning.

▼M8

Tabel 4

Liste over (10) kompetencestoffer til antagonistassay

	Stof (a)	CAS RN	ER STTA-assay (1)			VM7Luc ER TA-assay (2)			ER STTA (1) -kandidatvirkninger	ICCVAM (5) konsensusklassifikation	MeSH (6) kemisk gruppe	Produktgruppe (7)
			ER TA-aktivitet	IC_{50} (M)	Testkoncentrationsinterval (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50} (3) (M)	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) (4)				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	moderat POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt
4	17β-østradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	skal være negativ (*)	PN	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklisk forbindelse	Farvestof, naturprodukt, farmaceutisk mellemprodukt
6	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, phthalsyre	Kosmetisk ingrediens, industrikemikalie, blødgøringsmiddel

▼M8

	Stof [a]	CAS RN	ER STTA-assay [1]			VM7Luc ER TA-assay [2]			ER STTA [1] -kandidatvirkninger	ICCVAM [5] konsensusklassifikation	MeSH [6] kemisk gruppe	Produktgruppe [7]
			ER TA-aktivitet	IC_{50} (M)	Testkoncentrationsinterval (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50} [3] (M)	Højeste konc. ved bestemmelse af dosisinterval (M) [4]				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	skal være negativ (*)	PN	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	skal være negativ (*)	NEG	Flavonoid, heterocyklisk forbindelse	Naturprodukt, farmaceutisk produkt
9	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ikke testet	NEG	Phenol	Kemisk mellemprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	skal være negativ (*)	NEG	Kulbrinte (cyklisk)	Naturprodukt

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service; M = molær; IC_{50} = halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie; NEG = negativ; PN = formodet negativ; POS = positiv.

(*) Klassificeret som negativ i henhold til litteraturen (2).

([a]) Almindelige stoffer testet i STTA- og VM7Luc ER TA-assays, der blev kategoriseret som ER-antagonister eller negative og brugt til at vurdere nøjagtigheden i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (2) (3).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) De gennemsnitlige IC_{50}-værdier er beregnet ud fra værdier indberettet af laboratorierne i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen (XDS, ECVAM og Hiyoshi) (3).

([4]) De indberettede koncentrationer var de højeste testede koncentrationer (bestemmelse af dosisinterval) under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet. Hvis laboratoriernes koncentrationer var forskellige, er den højeste koncentration angivet. Se tabel 4-11 i ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Klassificeringen som ER-antagonister eller negative er baseret på oplysninger i ICCVAM's Background Review Documents (BRD) om ER-bindings- og TA-forsøgsmetoder (31) samt oplysninger fundet i publikationer udgivet og revideret efter færdiggørelsen af ICCVAM's BRD'er (2) (3) (18) (31).

([6]) Stofferne blev fordelt på en eller flere kemiske grupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Stofferne blev fordelt på en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (tilgængelig på: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Acceptkriterier for analyseserien

16. Accept eller forkastelse af en analyseserie er baseret på vurdering af de resultater, som er opnået for de referencestandarder og kontroller, der er anvendt til hvert enkelt forsøg. Referencestandardernes værdier for PC_{50} (EC_{50}) eller IC_{50} skal opfylde acceptkriterierne som fastsat i det valgte assay (jf. tillæg 2 for STTA, jf. tillæg 3 for VM7Luc ER TA), og alle positive/negative kontroller skal klassificeres korrekt for hvert accepteret forsøg. Evnen til at gennemføre assayet konsekvent skal påvises ved udvikling og vedligeholdelse af en historisk database for referencestandarderne og kontrollerne (jf. punkt 15). Standardafvigelser (SD) eller variationskoefficienter (CV) for gennemsnit af referencestandardernes kurvefittingsparametre fra flere forsøg kan anvendes som et mål for reproducerbarhed inden for laboratoriet. Endvidere skal følgende principper for acceptkriterier overholdes:

— Dataene skal være tilstrækkelige til kvantitativ vurdering af ER-aktivering (ved agonistassay) eller -undertrykkelse (ved antagonistassay) (dvs. effektivitet og styrke).

— Den gennemsnitlige reporteraktivitet for referencekoncentrationen af referenceøstrogen skal mindst være det minimum, der er fastsat i assayet, i forhold til aktiviteten i kontrollen med bærestof (opløsningsmiddel) for at sikre en passende følsomhed. For STTA- og VM7Luc ER TA-assays er dette fire gange aktiviteten i den gennemsnitlige kontrol med bærestof på hver plade.

— De testede koncentrationer skal forblive inden for testkemikaliernes opløselighedsinterval og må ikke påvise cytotoksisk effekt.

Analyse af data

17. Den fastlagte procedure for datafortolkning for hvert assay skal anvendes til klassificering af en positiv og negativ respons.

18. Hvis acceptkriterierne opfyldes (punkt 16), er det tegn på, at assayet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at alle analyseserier vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data. Hvis to analyseserier giver reproducerbare resultater (hvis f.eks. resultaterne af begge analyseserier viser, at et testkemikalie er positivt), er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie.

19. Hvis to analyseserier ikke giver reproducerbare resultater (hvis f.eks. et testkemikalie er positivt i én analyseserie og negativt i den anden analyseserie), eller hvis der stilles krav om større sikkerhed omkring resultatet af assayet, bør der gennemføres mindst tre uafhængige analyseserier. I dette tilfælde baseres klassificeringen på de to overensstemmende resultater af de tre.

Generelle kriterier for datafortolkning

20. Der findes for øjeblikket ikke nogen almindeligt anerkendt metode til fortolkning af ER TA-data. Både kvalitative (f.eks. positiv/negativ) og/eller kvantitative (f.eks. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) vurderinger af ER-medieret aktivitet bør være baseret på empiriske data og solid videnskabelig vurdering. Når det er muligt, skal de positive resultater karakteriseres ved både virkningens omfang sammenlignet med kontrollen med bærestof (opløsningsmiddel) eller referenceøstrogenet og den koncentration, hvorved virkningen opstår (f.eks. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} osv.).

▼**M8**

Testrapport

21. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Assay:

— det anvendte assay

— kontrol/referencestandard/testkemikalie

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— karakterisering (art, leverandør og batch)

— Begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

Celler:

— celletype og -oprindelse:

  • udtrykkes ER endogent? Hvis nej, hvilke(n) receptor(er) blev transfekteret?

  • anvendt(e) reporterkonstruktion(er) (herunder oprindelsesarter)

  • transfektionsmetode

  • eventuel udvælgelsesmetode til vedligeholdelse af stabil transfektion

  • er transfektionsmetoden relevant for stabile linjer?

— antal cellegenerationer (fra optøning)

▼**M8**

— cellernes generationsantal ved optøning

— metoder til opretholdelse af cellekulturer.

Testbetingelser:

— opløselighedsbegrænsninger

— Beskrivelse af de anvendte metoder til vurdering af levedygtighed

— mediesammensætning og CO_2-koncentration

— testkemikaliekoncentrationer

— mængde tilsat bærestof og testkemikalie

— inkubationstemperatur og -fugtighed

— Behandlingens varighed

— celletæthed ved behandlingsstart og undervejs i behandlingen

— positive og negative referencestandarder

— reporterreagenser (produktnavn, leverandør og batch)

— kriterier for bedømmelse af analyseserier som positive, negative eller usikre.

Testgodkendelse:

— foldinduktioner for hver assayplade og angivelse af, hvorvidt de opfylder assayets minimumskrav baseret på historiske kontroller

— faktiske værdier for acceptkriterier, f.eks. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ og Hills kurve-værdier, for sideløbende positive kontroller/referencestandarder.

Resultater:

— rådata og normaliserede data

— maksimalt foldinduktionsniveau

— cytotoksicitetsdata

— den laveste effektive koncentration (LEC), hvis den foreligger

— RPC_{Max}-, PC_{Max}-, PC_{50}-, IC_{50}- og/eller EC_{50}-værdier, hvis disse er relevante

— koncentration/respons-forhold, når det er muligt

▼M8

— eventuelle statistiske analyser sammen med en måling af fejl og konfidens (f.eks. middelfejlen på middeltallet (SEM), standardafvigelse, variationskoefficient eller 95 % CI) og en beskrivelse af, hvordan disse værdier er opnået.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367-73.

(5) Rogers J.M. og Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073-89.

(11) Younes M. og Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): s. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): s. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti-Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91-98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals, 28(1): s. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): s. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): s. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105-12.

(25) Deroo B.J. og Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. og Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor-Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): s. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. og Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

Acceptkriterier: minimumsstandarder for udførelse af forsøgskontroller og referencestandarder. Alle acceptkriterier skal være opfyldt, for at et forsøg kan betragtes som gyldigt.

Nøjagtighed (konkordans): overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans" forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (1).

Agonist: et stof, der giver en respons, f.eks. transkription, når det binder til en bestemt receptor.

Antagonist: en type receptorligand eller kemikalie, som ikke selv fremkalder en biologisk respons ved binding til en receptor, men blokerer eller dæmper agonist-medierede responser.

Antiøstrogenaktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af 17β-østradiol medieret gennem østrogenreceptorer.

Cellemorfologi: form og udseende af celler, der dyrkes i encellede lag på en vævsdyrkningsplade med én brønd. Døende celler udviser ofte en abnorm cellemorfologi.

CF: OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier).

Trækul-/dextranbehandling: behandling af serum, der benyttes i cellekultur. Behandling med trækul/dextran (ofte omtalt som "stripping") fjerner endogene hormoner og hormonbindende proteiner.

Kemikalie: et stof eller en blanding

Cytotoksisk effekt: skadelige virkninger i cellestruktur eller -funktion, som i sidste ende forårsager celledød og kan afspejles i en reduktion i antallet af celler i brønden ved afslutningen af eksponeringsperioden eller en reduktion i kapaciteten til måling af cellefunktionen ved sammenligning med den sideløbende bærestofkontrol.

CV: Coefficient of variation (variationskoefficient)

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum (føtalt kalveserum behandlet med dextranovertrukket trækul).

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

E2: 17β-østradiol

EC50: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie

ED: hormonforstyrrende virkning

hERα: human østrogenreceptor alfa

▼**M8**

hERß: human østrogenreceptor beta

EFM: østrogenfrit medium. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) suppleret med 4,5 % aktivt kul-/dextranbehandlet FBS, 1.9 % L-glutamin og 0,9 % pen-Strep.

ER: østrogenreceptor

ERE: østrogenresponselement

Østrogenaktivitet: et kemikalies evne til at efterligne 17β-østradiol i dets evne til at binde sig til og aktivere østrogenreceptorer. hERα-medieret østrogenaktivitet kan spores med denne forsøgsmetode.

ERTA: transaktivering af østrogenreceptorer

FBS: føtalt kalveserum

HeLa: en udødelig human cervikal cellelinje

HeLa9903: en underklon af en HeLa-celle, hvori hERααog et luciferasereportergen er blevet stabilt transfekteret

IC_{50}: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et inhiberende testkemikalie

ICCVAM: US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme stoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad et assay kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (1).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved at anvende en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også "intern reproducerbarhed" (1).

LEC: den laveste effektive koncentration er testkemikaliets laveste koncentration, som fremkalder en respons (dvs. den laveste testkemikaliekoncentration, ved hvilken foldinduktionen er statistisk forskellig fra den sideløbende bærestofkontrol)

Me-too test: populært udtryk for et assay, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referenceforsøgsmetode. Benyttes som synonym for tilsvarende forsøgsmetode

MT: metallothionein

MMTV: mamatumorvirus hos mus

OHT: 4-hydroxytamoxifen

PBTG: ydeevnebaseret forsøgsretningslinje

▼M8

PC (positiv kontrol): et stærkt aktivt stof, fortrinsvis 17ß-østradiol, der er inkluderet i alle test for at bidrage til, at assayet fungerer tilfredsstillende

PC_{10}: den koncentration af et testkemikalie, hvor den målte aktivitet i et agonist-assay er 10 % af den maksimale aktivitet, der er fremkaldt af PC (E2 ved 1 nM for STTA-assayet) i hver plade.

PC_{50}: den koncentration af et testkemikalie, hvor den målte aktivitet i et agonist-assay er 50 % af den maksimale aktivitet, der er fremkaldt af PC (E2 ved den referencekoncentration, der er specificeret i forsøgsmetoden) i hver plade.

PC_{Max}: den koncentration af et testkemikalie, som fremkalder RPCMax

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i et valideret assay danner grundlag for at vurdere, om et foreslået assay, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenligneligt. De indeholder (1) de centrale dele af assayet, (2) en minimumsliste over referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der anvendes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (3) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at det foreslåede assay kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten over referencekemikalier (1).

Kompetencestoffer: en delmængde af referencestoffer, der indgår i ydeevnestandarderne, og som kan anvendes af laboratorier til at påvise teknisk kompetence med en standardiseret forsøgsmetode. Udvælgelseskriterier for disse stoffer omfatter typisk, at de repræsenterer responsområdet, fås i handelen, og at der foreligger referencedata af høj kvalitet.

Kompetence: dokumenteret evne til at gennemføre et assay korrekt, før ukendte stoffer testes.

Referenceøstrogen (positiv kontrol, PC): 17β-østradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referencestandard: et referencestof, der anvendes til at påvise tilstrækkeligheden af et assay. 17β-østradiol er referencestandarden for STTA og VM7Luc ER TA-assays.

Referenceforsøgsmetoder: de assays, hvorpå PBTG 455 er baseret.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem et assay og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang assayet måler eller forudsiger den relevante biologiske virkning korrekt. Assayets nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dets relevans (1).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad et assay kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når det udføres efter samme protokol. Det bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier.

RLU: relative lysenheder

RNA: ribonukleinsyre

RPC_{Max}: maksimalt responsniveau fremkaldt af et testkemikalie, udtrykt som en procentdel af den respons, der fremkaldes af 1 nM E2 på den samme plade

▼M8

RPMI: RPMI 1 640-medium suppleret med 0,9 % Pen-Strep og 8,0 % føtalt kalveserum (FBS)

Analyseserie: et individuelt forsøg, der vurderer den kemiske påvirkning af assayets biologiske udfald. Hver enkelt analyseserie er et fuldstændigt forsøg udført på replikatbrønde med celler udpladet fra en fælles cellepool på samme tid.

Uafhængig analyseserie: et særskilt uafhængigt forsøg, der vurderer den kemiske påvirkning af assayets biologiske udfald ved hjælp af celler fra en anden pool og frisk fortyndede kemikalier, udført på forskellige dage eller på den samme dag af andet personale.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive stoffer, der klassificeres korrekt ved assayet. Den er et mål for nøjagtigheden af et assay, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af et assays relevans (1).

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive stoffer, som klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af et assay, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af et assays relevans (1).

Stabil transfektion: når DNA transfekteres ind i dyrkede celler på en sådan måde, at det integreres stabilt i cellernes genom og resulterer i en stabil ekspression af transfekterede gener. Kloner af stabilt transfekterede celler udvælges af stabile markører (f.eks. modstand mod G418)

STTA-assay: stabilt transfekteret transaktiveringsassay, ERα-transkriptionsaktiveringsassay, der anvender HeLa 9 903-cellelinje

Undersøgelse: hele rækken af forsøgsarbejdsopgaver, der udføres for at vurdere et enkelt specifikt stof ved hjælp af et bestemt assay. En undersøgelse omfatter alle skridt, herunder opløsningstest af teststoffet i testmediet, forprøve til bestemmelse af dosisintervaller, alle nødvendige omfattende analyseserier, dataanalyser, kvalitetssikring, vurderinger af den cytotoksiske effekt osv. Gennemførelse af en undersøgelse gør det muligt at klassificere testkemikaliets aktivitet på det toksicitetsmål (dvs. aktiv, inaktiv eller usikker), der vurderes med det anvendte assay, og foretage et skøn over styrke i forhold til det positive referencekemikalie.

Stof: i henhold til REACH ([1]) defineres et stof som et grundstof og forbindelser heraf, naturligt eller industrielt fremstillet, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning. Der benyttes en lignende definition i forbindelse med UN GHS (1).

TA (Transaktivering): igangsættelse af mRNA-syntese som reaktion på et bestemt kemisk signal såsom binding af et østrogen til østrogenreceptoren

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF (EUT L 304 af 22.11.2007, s. 1).

▼**M8**

Assay: i forbindelse med denne forsøgsmetode er et assay en af de metoder, der accepteres som gyldig med hensyn til opfyldelse af de skitserede ydeevnekriterier. Assayets komponenter omfatter f.eks. den specifikke cellelinje med tilhørende vækstbetingelser, særlige medier, hvori testen udføres, pladeopstillingsbetingelser, opstilling og opløsninger af testkemikalier sammen med alle andre nødvendige kvalitetskontrolforanstaltninger og tilhørende dataevalueringsskridt.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Transskription: mRNA-syntese

UVCB: kemiske stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer

Valideret forsøgsmetode: et assay, for hvilket der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har en tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (1).

Validering: den proces, hvorved pålideligheden og relevansen af en bestemt tilgang, metode, proces eller vurdering eller et bestemt assay fastslås til et defineret formål (1).

VC (bærestofkontrol): Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse test- og kontrolkemikalier, testes alene som bærestof uden opløst kemikalie.

VM7: en udødeliggjort adenocarcinomcelle, som endogent udtrykker østrogenreceptoren

VM7Luc4E2: VM7Luc4E2-cellelinjen blev afledt af VM7 udødeliggjorte humant afledte adenocarcinomceller, som endogent udtrykker begge former for østrogenreceptorer (ERα og ERβ) og er blevet stabilt transfekteret med plasmidet pGudLuc7.ERE. Dette plasmid indeholder fire kopier af et syntetisk oligonukleotid, som indeholder østrogenresponselementet umiddelbart før promotoren for brysttumorvirus hos mus (MMTV) og luciferasegenet fra ildfluer.

Svagt positiv kontrol: et svagt aktivt stof, der vælges fra listen over referencekemikalier, og som indgår i alle forsøg for at bidrage til, at assayet fungerer tilfredsstillende.

▼**M8**

Tillæg 2

TRANSAKTIVERINGSASSAY MED STABILT TRANSFEKTERET HUMAN ØSTROGENRECEPTOR-α TIL PÅVISNING AF ØSTROGENAGONIST- OG ØSTROGENANTAGONISTAKTIVITET I KEMIKALIER, DER ANVENDER HERα-HELA-9903-CELLELINJEN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette transaktiveringsassay (TA) anvender hERα-HeLa-9903-cellelinjen til at påvise østrogenagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hERα). Den valideringsundersøgelse af det stabilt transfekterede transaktiveringsassay (STTA), som blev foretaget af det japanske Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), der anvender hERα-HeLa-9903-cellelinjen til at påvise østrogenagonist- og østrogenantagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hERα), viste assayets relevans og pålidelighed i overensstemmelse med dets formål (1).

2. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hERα-medieret TA ved at måle kemiluminescens som effektparameter. Der findes imidlertid rapporter om ikke-receptormedierede luminescenssignaler ved højere koncentrationer af fytoøstrogen end 1 μM på grund af overaktivering af luciferasereportergenet (2) (3). Mens dosis/respons-kurven tyder på, at der sker en egentlig aktivering af ER-systemet ved lavere koncentrationer, skal den luciferaseekspression, som opnås ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller lignende kemiske stoffer, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende overaktivering af luciferasereportergenet, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER TA-assaysystemer (tillæg 1).

3. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 2.1.

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

4. Assayet bruges til at signalere binding af østrogenreceptoren til en ligand. Efter ligandbindingen forflytter receptorligandkomplekset sig til kernen, hvor det binder specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et ildflue-luciferasereportergen, hvilket resulterer i øget cellulær ekspression af luciferaseenzym. Luciferin er et medium, der omdannes af luciferaseenzymet til et bioluminescensprodukt, som måles kvantitativt med et luminometer. Luciferaseaktivitet kan vurderes hurtigt og billigt med forskellige typer testkit, der kan fås i handelen.

5. Testsystemet anvender hERα-HeLa-9903-cellelinjen, der er afledt af en human cervikal tumor med to stabilt indsatte konstruktioner: (i) hERα-ekspressionskonstruktion (med indkodning af den humane receptor i fuld længde) og (ii) en ildflueluciferasereporter-konstruktion med fem tandem-gentagelser af et vitellogenint østrogenresponselement (ERE) drevet af et metallothioneinpromotor (MT) TATA-element fra mus. MT TATA-genkonstruktionen i mus har vist sig at have den bedste ydeevne og anvendes derfor normalt. Denne hERα-HeLa-9903-cellelinje kan derfor måle et testkemikalies evne til at fremkalde hERα-medieret transaktivering af luciferasegenekspression.

▼M8

6. Ved anvendelse af ER-agonistassays er datafortolkningen baseret på, om det maksimale responsniveau fremkaldt af et testkemikalie er lig med eller overstiger en agonistrespons, der svarer til 10 % af det, der fremkaldes af en maksimalt inducerende (1 nM) koncentration af den positive kontrol (PC) 17β-østradiol (E2) (dvs. PC10). Ved anvendelse af et ER-antagonistassay er datafortolkningen baseret på, om responsen viser en mindst 30 % aktivitetsreduktion fra den respons, der induceres af spike-in-kontrollen (25 pM af E2) uden cytotoksisk effekt. Dataanalyse og -fortolkning diskuteres nærmere i punkt 34-48.

FREMGANGSMÅDE

Cellelinjer

7. Den stabilt transfekterede hERα-HeLa-9903-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen kan fås fra den japanske Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1]) ved underskrivelse af en materialeoverførselsaftale (MTA).

8. Der bør kun anvendes mykoplasmafrie celler i test. RT-PCR (realtidspolymerasekædereaktion) er den foretrukne metode til en sensitiv påvisning af mykoplasmainfektion (4) (5) (6).

Cellelinjens stabilitet

9. For at overvåge cellelinjens stabilitet bør E2, 17α-østradiol, 17α-methyltestosteron og corticosteron anvendes som referencestandarder for agonistassayet, og der bør mindst én gang, hver gang assayet udføres, måles en fuldstændig koncentration/respons-kurve i testkoncentrationsområdet, som er angivet i tabel 1, og resultaterne bør være i overensstemmelse med resultaterne i tabel 1.

10. Ved anvendelse af et antagonistassay bør der samtidig med hver analyseserie måles fuldstændige koncentrationskurver for to referencestandarder, tamoxifen og flutamid. En korrekt kvalitativ klassificering som positiv eller negativ for de to kemikalier bør overvåges.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

11. Celler bør opbevares i Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) uden fenolrød, suppleret med 60 mg/l antibiotisk kanamycin og 10 % dextranovertrukket trækulsbehandlet føtalt kalveserum (DCC-FBS), i en CO2-inkubator (5 % CO2) ved 37 ± 1°C. Ved en konfluens på 75-90 % kan celler dyrkes i subkultur ved 10 ml 0,4 × 105 – 1 × 105 celler/ml pr. 100 mm celledyrkningsskål. Celler bør suspenderes med 10 % FBS-EMEM (der er det samme som EMEM med DCC-FBS) og dernæst udplades i brønde på en mikroplade med en tæthed på 1 × 104 celler/(100 µl pr. brønd). Herefter bør cellerne præinkuberes i en 5 % CO2-inkubator ved 37 ± 1°C i 3 timer før den kemiske eksponering. Plastudstyr bør være fri for østrogenaktivitet.

12. For at opretholde responsens integritet bør cellerne dyrkes til mere end én generation fra den nedfrosne beholdning i det konditionerede dyrkningsmedium og bør ikke dyrkes til mere end 40 generationer. For hERα-HeLa-9903-cellelinjen vil dette være under tre måneder. Cellernes ydeevne kan dog reduceres, hvis de dyrkes under uhensigtsmæssige dyrkningsbetingelser.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Fax: +81-72-641-9812.

▼M8

13. DCC-FBS kan fremstilles som beskrevet i tillæg 2.2 eller fås i handelen.

Acceptkriterier

Positive og negative referencestandarder for ER-agonistassay

14. Før og i løbet af undersøgelsen kontrolleres testsystemets responsivitet ved hjælp af passende koncentrationer af et stærkt østrogen: E2, et svagt østrogen (17α-østradiol), en meget svag agonist (17α-methyltestosteron) og et negativt stof (corticosteron). Acceptable områdeværdier fra valideringsundersøgelsen (1) er anført i tabel 1. Disse fire sammenfaldende referencestandarder bør inkluderes i hvert forsøg, og resultaterne bør falde inden for de angivne acceptable grænser. Hvis dette ikke er tilfældet, bør årsagen til, at acceptkriterierne ikke er opfyldt, bestemmes (f.eks. cellehåndtering samt kvalitet og koncentration af serum og antibiotika), og assayet gentages. Når acceptkriterierne eropfyldt, er det væsentligt at sikre en minimumsvariation mellem EC_{50}-, PC_{50}- og PC_{10}-værdier og en konsekvent anvendelse af materialer til celledyrkning. De fire sideløbende referencestandarder, som bør inkluderes i hvert forsøg (der udføres under samme betingelser, herunder materialer, cellegenerationsniveau og teknikere), kan sikre assayets følsomhed, fordi PC_{10}-værdier af de tre positive referencestandarder bør ligge inden for det acceptable område, og det samme bør PC_{50}- og EC_{50}-værdier, hvor de kan beregnes (se tabel 1).

Tabel 1

Acceptable områdeværdier for de fire referencestandarder for ER-agonistassays

Navn	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hills kurve	Måleområde
17β-østradiol (E2) CAS-nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-østradiol CAS-nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Corticosteron CAS-nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-methyltestosteron CAS-nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Positive og negative referencestandarder for ER-antagonistassay

15. Før og i løbet af undersøgelsen bør testsystemets responsivitet kontrolleres ved hjælp af passende koncentrationer af et positivt stof (tamoxifen) og et negativt stof (flutamid). Acceptable områdeværdier fra valideringsundersøgelsen (1) er anført i tabel 2. Disse to sideløbende referencestandarder inkluderes i hvert forsøg, og resultaterne bedømmes korrekt som vist i kriterierne. Hvis dette ikke er tilfældet, bestemmes årsagerne til, at kriterierne ikke er opfyldt (f.eks. cellehåndtering samt kvalitet og koncentration af serum og antibiotika), og assayet gentages. Endvidere bør IC_{50}-værdier for et positivt stof (tamoxifen) beregnes, og resultaterne bør falde inden for de givne acceptable grænser. Når acceptkriterierne er opfyldt, er det væsentligt at sikre minimumsvariation mellem IC50-værdier og konsekvent anvendelse af materialer til celledyrkning. De to sammenfaldende referencestandarder, som bør inkluderes i hvert forsøg (der udføres under samme betingelser, herunder materialer, cellegenerationsniveau og teknikere), kan sikre assayets følsomhed (se tabel 2).

▼M8

Tabel 2

Kriterier og acceptable områdeværdier for de to referencestandarder for ER-antagonistassay

Navn	Kriterier	$LogIC_{50}$	Måleområde
Tamoxifen CAS-nr.: 10540-29-1	Positiv: IC50 bør beregnes	-5,942~-7,596	10-10~10-5M
Flutamid CAS-nr.: 13311-84-7	Negativ: IC30 bør ikke beregnes	—	10-10~10-5M

Positiv kontrol og bærestofkontrol

16. Den positive kontrol (PC) for ER-agonistassay (1 nM af E2) og for ER-antagonistassay (10 μM TAM) bør testes mindst in triplo på hver plade. Det bærestof, som anvendes til at opløse et testkemikalie, bør testes som en bærestofkontrol (VC) mindst in triplo på hver plade. Hvis der ved den positive kontrol (PC) anvendes et andet bærestof end testkemikaliet, bør der ud over denne bærestofkontrol (VC) testes en anden VC mindst in triplo på den samme plade med PC.

Kvalitetskriterier for ER-agonistassay

17. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet for den positive kontrol (1 nM E2) bør være mindst 4 fold den gennemsnitlige VC på hver plade. Dette kriterium fastlægges på grundlag af pålideligheden af værdierne for effektparametrene fra valideringsundersøgelsen (historisk mellem 4 og 30 fold).

18. Med hensyn til kvalitetskontrollen af assayet bør foldinduktionen svarende til PC10-værdien af den sideløbende PC (1 nM E2) være større end 1+2 standardafvigelser af foldinduktionsværdien (=1) af den sideløbende VC. Med henblik på prioritering kan PC10-værdien være nyttig til at forenkle den nødvendige dataanalyse sammenlignet med en statistisk analyse. Selv om en statistisk analyse giver oplysninger om signifikans, er en sådan analyse ikke en kvantitativ parameter med hensyn til koncentrationsbaseret potentiale og er således mindre nyttig til prioriteringsformål.

Kvalitetskriterier for ER-antagonistassay

19. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet af spike-in-kontrollen (25 nM E2) bør være mindst 4 fold den gennemsnitlige VC på hver plade. Dette kriterium fastlægges på grundlag af pålideligheden af værdierne for effektparametrene fra valideringsundersøgelsen.

20. Med hensyn til kvalitetskontrollen af assayet bør den relative transkriptionsaktivering (RTA) af 1 nM E2 være større end 100 %, RTA af 1 μM 4-hydroxytamoxifen (OHT) bør ligge under 40,6 %, og RTA af 100 μM digitonin (Dig) bør være under 0 %.

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" under denne forsøgsmetode).

Bærestof

21. Dimethylsulfoxid (DMSO) eller et passende opløsningsmiddel med samme koncentration, som anvendes til de forskellige positive og negative kontroller og testkemikalier, bør anvendes som den sideløbende VC. Testkemikalier bør opløses i et opløsningsmiddel, som opløser det pågældende testkemikalie og kan blandes med cellemediet. Vand, ethanol (95-100 % renhed) og DMSO er egnede bærestoffer. Hvis der anvendes DMSO, bør niveauet ikke overstige 0,1 % (v/v). For ethvert bærestof bør det påvises, at den maksimalt anvendte mængde ikke er cytotoksisk og ikke indvirker på assayets ydeevne.

▼M8

Præparering af testkemikalier

22. Generelt bør testkemikalier opløses i DMSO eller et andet egnet opløsningsmiddel og fortyndes serielt med det samme opløsningsmiddel i et fælles forhold på 1:10 for at fremstille opløsninger til fortynding med mediet.

Opløselighed og cytotoksisk effekt: Overvejelser vedrørende bestemmelse af dosisinterval

23. Der bør udføres en forprøve for at bestemme et passende koncentrationsområde for det kemikalie, der skal testes, og fastslå, om der kan være nogen problemer forbundet med testkemikaliets opløselighed og cytotoksiske effekt. Indledningsvis testes kemikalier op til den maksimale koncentration på 1 µl/ml, 1 mg/ml eller 1 mM, (den laveste af de tre). Baseret på omfanget af den cytotoksiske effekt eller manglende opløselighed observeret i forprøven bør den første endelige analyseserie teste kemikaliet ved log-seriefortyndinger med start ved den maksimale acceptable koncentration (f.eks. 1 mM, 100 µM, 10 µM osv.), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarheder eller cytotoksisk effekt. Koncentrationer i den anden og, om nødvendigt, i den tredje analyseserie bør justeres, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentration/respons-kurven og undgå koncentrationer, der er uopløselige eller fremkalder for høj cytotoksisk effekt.

24. For ER-agonister og -antagonister kan tilstedeværelsen af stigende cytotoksicitetsniveauer i væsentlig grad ændre eller fjerne den typiske sigmoidale respons og bør tages i betragtning ved fortolkningen af data. Der bør anvendes forsøgsmetoder vedrørende cytotoksisk effekt, som kan give oplysninger om 80 % levedygtighed i celler, idet der benyttes et passende assay baseret på laboratoriets erfaringer.

25. Skulle resultaterne af cytotoksicitetstesten vise, at koncentrationen af testkemikaliet har reduceret antallet af celler med 20 % eller derover, bør denne koncentration betragtes som cytotoksisk, og der bør i vurderingen ses bort fra koncentrationer på eller over den cytotoksiske koncentration.

Eksponering for kemikaliet og organisering af assaypladen

26. Proceduren for kemiske fortyndinger (trin 1 og 2) og celleeksponering (trin 3) kan gennemføres på følgende måde:

Trin 1: Hvert testkemikalie fortyndes serielt i DMSO eller et passende opløsningsmiddel og tilsættes til brøndene på en mikrotiterplade for at opnå endelige seriekoncentrationer som fastlagt ved forprøven til bestemmelse af dosisinterval (typisk i en serie på f.eks. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM og 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) til test in triplo.

Trin 2: Kemikaliefortynding: Fortynd først 1,5 µl af testkemikaliet i opløsningsmidlet til en mængde på 500 µl medium.

Trin 3: Eksponering af cellerne for kemikaliet: Tilsæt 50 µl af fortyndingen med mediet (præpareret under trin 2) til en assaybrønd indeholdende 10^4 celler/100 µl/brønd.

Den anbefalede endelige mængde medium, der kræves til hver brønd, er 150 µl. Testprøver og referencestandarder kan tilordnes som vist i tabel 3 og tabel 4.

▼**M8**

Tabel 3

Eksempel på pladekoncentrationsfordeling af referencestandarderne på assaypladen i ER-agonistassayet

Række	17α-methyltestosteron			Corticosteron			17α-østradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2)

27. Referencestandarderne (E2, 17α-østradiol, 17α-methyltestosteron og corticosteron) testes i hver analyseserie (tabel 3). PC-brønde behandlet med 1 nM af E2, som kan frembringe en E2-induktion, og VC-brønde behandlet med DMSO (eller et passende opløsningsmiddel) alene bør inkluderes på hver testassayplade (tabel 4). Hvis der anvendes celler fra forskellige kilder (f.eks. forskelligt generationsnummer, forskellig batch osv.) i det samme forsøg, bør referencestandarderne testes for hver cellekilde.

Tabel 4

Eksempel på pladekoncentrationsfordeling for test- og pladekontrolkemikalier på assaypladen i ER-agonistassayet

Række	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Række	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2)

Tabel 5

Eksempel på pladekoncentrationsfordeling af referencestandarder på assaypladen i ER-antagonistassayet

Række	Tamoxifen			Flutamid			Testkemikalie 1			Testkemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonin.

= spiket med 25 pM E2.

28. For at vurdere kemikaliers antagonistaktivitet bør assaybrønde placeret i rækker fra A til G spikes med 25 pM E2. Referencestandarderne (tamoxifen og flutamid) testes i hver analyseserie. I hver testassayplade bør der inkluderes PC-brønde behandlet med 1 nM E2, der kan benyttes til kvalitetskontrol af hERα-HeLa-9903-cellelinje, VC-brønde behandlet med DMSO (eller et egnet opløsningsmiddel), 0,1 % DMSO-brønde behandlet med DMSO-tilsætning til den spikede E2 svarende til "spike-in-kontrol", brønde behandlet med den endelige koncentration 1 μM OHT og brønde behandlet med 100 μM Dig (tabel 5). Den efterfølgende assayplade bør følge det samme pladelayout uden referencestandardbrønde (tabel 6). Hvis der anvendes celler fra forskellige kilder (f.eks. forskelligt generationsnummer, forskellig batch osv.) i det samme forsøg, bør referencestandarderne testes for hver cellekilde.

▼M8

Tabel 6

Eksempel på pladekoncentrationsfordeling for test- og pladekontrolkemikalier på assaypladen i ER-antagonistassayet

Række	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Bærestofkontrol (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontrol (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonin.

: Spiket med 25 pM E2.

29. De manglende randeffekter bør bekræftes, hvis det er relevant, og hvis der er mistanke om randeffekter, bør pladelayoutet ændres for at undgå sådanne effekter. F.eks. kan der anvendes et pladelayout, hvor der ses bort fra randbrønde.

30. Efter tilsætning af kemikalierne bør assaypladerne inkuberes i en 5 % CO2-inkubator ved 37 ± 1°C i 20-24 timer for at fremkalde reportergenprodukter.

31. Der skal tages særlige hensyn ved meget flygtige forbindelser. I sådanne tilfælde kan de tilstødende kontrolbrønde generere falsk positive resultater, og dette bør tages i betragtning i lyset af forventede og historiske kontrolværdier. I de få tilfælde, hvor der kan være bekymring for flygtighed, anbefales det at anvende pladeforseglere, som kan bidrage til effektivt at isolere individuelle brønde under testningen.

32. Der bør udføres gentagne endelige test for det samme kemikalie på forskellige dage for at sikre uafhængighed.

Luciferaseassay

33. Til assayet kan der anvendes et kommercielt luciferaseassayreagens [f.eks. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 eller tilsvarende)] eller et standard luciferaseassaysystem (f.eks. Promega, E1500 eller tilsvarende), så længe acceptkriterierne opfyldes. Assayreagenser bør vælges på grundlag af det anvendte luminometers følsomhed. Når der bruges et standardsystem til luciferaseassays, bør der anvendes et cellekulturlysisreagens (f.eks. Promega, E1531 eller tilsvarende), før mediet tilsættes. Luciferasereagenset bør anvendes efter producentens vejledning.

ANALYSE AF DATA

ER-agonistassay

34. For ved anvendelse af et ER-agonistassay at opnå den relative transkriptionsaktivitet for PC (1 nM af E2) kan luminescenssignalerne fra den samme plade analyseres i overensstemmelse med følgende trin (andre tilsvarende matematiske processer kan også accepteres):

Trin 1. Beregn middelværdien for VC.

▼M8

Trin 2. Træk middelværdien af VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

Trin 3. Beregn gennemsnittet for den normaliserede PC.

Trin 4. Divider den normaliserede værdi af hver brønd på pladen med middelværdien af den normaliserede PC (PC=100 %).

Den endelige værdi for hver brønd er den relative transkriptionsaktivitet for den pågældende brønd sammenlignet med PC-responsen.

Trin 5. Beregn middelværdien af den relative transaktionsaktivitet for hver af testkemikaliets koncentrationsgrupper. Der er to dimensioner for responsen: den gennemsnitlige transkriptionsaktivitet (respons) og den koncentration, hvorved responsen opstår (se næste afsnit).

Overvejelser vedrørende EC_{50}-, PC_{50} - og PC_{10}-induktion

35. Den fuldstændige koncentration/respons-kurve er nødvendig til beregning af EC50, men dette er måske ikke altid muligt eller praktisk gennemførligt på grund af begrænsninger i testkoncentrationsområdet (f.eks. på grund af cytotoksicitets- eller opløselighedsproblemer). Da EC50 og det maksimale induktionsniveau (svarende til den højeste værdi af Hill-ligningen) er informative parametre, bør disse parametre angives, hvor det er muligt. Til beregning af EC50 og det maksimale induktionsniveau bør der anvendes egnet statistisk software (f. eks. det statistiske software Graphpad Prism). Hvis Hills logistiske ligning skal anvendes på dataene om koncentrationsrespons, bør EC50 beregnes efter følgende ligning (7):

Y=bund + (top-bund) / (1+10 exp ((log EC50 -X) × Hills kurve)), hvor:

X er logaritmen af koncentration, og

Y er responsen, og Y starter ved bunden og går til toppen i en sigmoidal kurve. Bunden er fastsat til nul i Hills logistiske ligning.

36. For hvert testkemikalie angives følgende:

RPCMax, som er det maksimale responsniveau fremkaldt af et testkemikalie, udtrykt som en procentdel af den respons, som fremkaldes af 1 nM E2 på den samme plade, samt PC_{Max} (koncentration, der er forbundet med RPCMax), og

for positive kemikalier, de koncentrationer, der fremkalder PC10 og, hvis det er relevant, PC50.

37. PCx-værdien kan beregnes ved at interpolere mellem to punkter i X-Y-koordinatsystemet, ét umiddelbart over og ét umiddelbart under en PCx-værdi. Når de datapunkter, der ligger umiddelbart over og under PCx-værdien, har koordinaterne henholdsvis (a,b) og (c,d), kan PCx-værdien beregnes ved hjælp af følgende ligning:

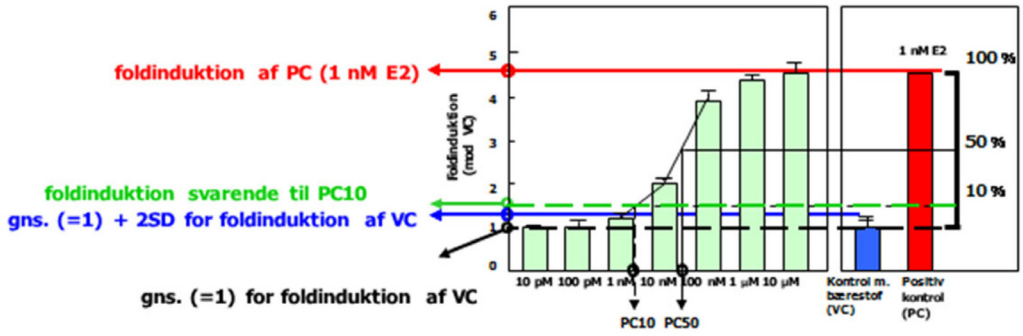
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. Beskrivelser af PC-værdierne er anført i figur 1 nedenfor.

Figur 1

Eksempel på, hvordan man udleder PC-værdier. PC (1 nM E2) tilføres på hver assayplade.



ER-antagonistassay

39. For ved anvendelse af et ER-antagonistassay at opnå den relative transkriptionsaktivitet (RTA) i forhold til den spikede kontrol (25 pM E2) kan luminescenssignalerne fra den samme plade analyseres i overensstemmelse med følgende trin (andre tilsvarende matematiske processer kan også accepteres):

Trin 1. Beregn middelværdien for VC.

Trin 2. Træk middelværdien af VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene. Trin 3. Beregn middelværdien for den normaliserede spikede kontrol.

Trin 4. Divider den normaliserede værdi af hver brønd på pladen med middelværdien af den normaliserede spikede kontrol (spiket kontrol=100 %).

Den endelige værdi af hver brønd er den relative transkriptionsaktivitet for den pågældende brønd sammenlignet med responsen i den spikede kontrol.

Trin 5. Beregn middelværdien af den relative transaktionsaktivitet for hver behandling.

Overvejelser vedrørende IC_{30}- og IC_{50}-induktion

40. For positive kemikalier angives de koncentrationer, der fremkalder IC30 og, hvis det er relevant, IC50.

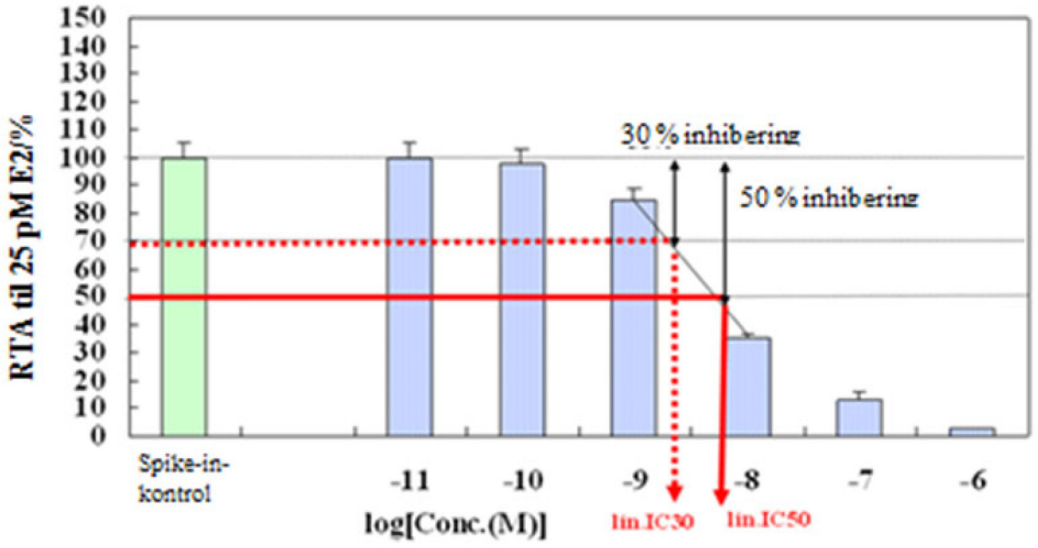
41. ICx-værdien kan beregnes ved at interpolere mellem to punkter i X-Y-koordinatsystemet, ét umiddelbart over og ét umiddelbart under en ICx-værdi. Når de datapunkter, der ligger umiddelbart over og under ICx-værdien, har koordinaterne henholdsvis (c,d) og (a,b), kan ICx-værdien beregnes ved hjælp af følgende ligning:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

Figur 2

Eksempel på udledning af IC-værdier. Den spikede kontrol (25 pM E2) tilføres på hver assayplade.



RTA: relativ transkriptionsaktivitet

42. Resultaterne bør baseres på to (eller tre) uafhængige analyseserier. Hvis to analyseserier giver sammenlignelige og derfor reproducerbare resultater, er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. For at resultaterne kan godkendes, skal de:

— opfylde acceptkriterierne (se Acceptkriterier, punkt 14-20)

— kunne reproduceres.

Kriterier for datafortolkning

Tabel 7

Positive og negative beslutningskriterier i et ER-agonistassay

Positive	Hvis den opnåede RPC_{Max} er lig med eller overstiger 10 % af responsen for den positive kontrol i mindst to af to eller to af tre analyseserier.
Negative	Hvis den opnåede RPC_{Max} ikke kommer op på mindst 10 % af responsen for den positive kontrol i to af to eller to af tre analyseserier.

Tabel 8

Positive og negative beslutningskriterier i et ER-antagonistassay

Positive	Hvis IC30 beregnes i mindst to af to eller to af tre analyseserier.
Negative	Hvis IC30 ikke beregnes i to af to eller to af tre analyseserier.

▼**M8**

43. Kriterierne for datafortolkning fremgår af tabel 7 og 8. Positive resultater vil blive karakteriseret ved både effektens størrelsesorden og den koncentration, hvor effekten opstår. Når resultater udtrykkes som en koncentration, hvor 50 % (PC50) eller 10 % (PC10) af PC-værdierne nås for agonistassayet, og 50 % (IC50) eller 30 % (IC30) af den spikede kontrolværdi hæmmes for antagonistassayet, opfyldes begge disse mål. Et testkemikalie bestemmes til at være positivt, hvis den maksimale respons, der fremkaldes af testkemikaliet (RPCMax), er lig med eller overstiger 10 % af responsen fra PC i mindst to af to eller to af tre analyseserier, mens et testkemikalie betragtes som negativt, hvis RPCMax ikke kommer op på mindst 10 % af responsen fra den positive kontrol i to af to eller to af tre analyseserier.

44. Beregningerne af PC10, PC50 og PCMax i et ER-agonistassay og IC30 og IC50 i et ER-antagonistassay kan foretages ved hjælp af et regneark, der er tilgængeligt sammen med testvejledningen på OECD's offentlige websted ([1]).

45. Det bør være tilstrækkeligt at opnå PC10- eller PC50- og IC30- eller IC50-værdier mindst to gange. Skulle den deraf følgende basislinje for data i det samme koncentrationsområde udvise en variation med en uacceptabelt høj variationskoefficient (CV; %), kan dataene dog ikke anses for pålidelige, og årsagen til den høje variation bør afdækkes. CV af rådata fra tre forsøg (dvs. data om luminescensintensitet) for de datapunkter, som anvendes til beregning af PC10, bør ligge under 20 %.

46. Hvis acceptkriterierne opfyldes, er det tegn på, at assaysystemet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at en given analyseserie vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data.

47. Ved et ER-agonistassay, hvor der er behov for flere oplysninger end dem, der skal bruges til screening og prioritering til denne testvejledning for positive testkemikalier, især for PC10-PC49-kemikalier samt kemikalier, der er mistænkt for at overstimulere luciferase, kan det bekræftes, at den observerede luciferaseaktivitet udelukkende er en ERα-specifik respons, der anvender en ERα-antagonist (se tillæg 2.1).

TESTRAPPORT

48. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

LITTERATUR

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769-71.

(6) Dussurget O. og Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. og Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Tillæg 2.1

FALSK POSITIVE RESULTATER: VURDERING AF IKKE-RECEPTORMEDIEREDE LUMINESCENSSIGNALER

1. Falsk positive fund i ER-agonistassayet kan være genereret af ikke-ER-medieret aktivering af luciferasegenet eller direkte aktivering af genproduktet eller urelateret fluorescens. Sådanne virkninger angives ved en ufuldstændig eller usædvanlig dosis/respons-kurve. Hvis der er mistanke om sådanne virkninger, bør det undersøges, hvordan en ER-antagonist (f.eks. 4-hydroxytamoxifen (OHT) ved en ikke-toksisk koncentration) påvirker responsen. Den rene antagonist ICI 1827 80 er måske ikke egnet til dette formål, da en tilstrækkelig koncentration af ICI 1827 80 kan sænke VC-værdien, og dette vil påvirke dataanalysen.

2. For at sikre validiteten af denne tilgang skal følgende testes på den samme plade:

   — det ukendte kemikalies agonistiske aktivitet med/uden 10 μM OHT

   — VC (in triplo)

   — OHT (in triplo)

   — 1 nM E2 (in triplo) som agonist-PC

   — 1 nM E2 + OHT (in triplo)

Kriterier for datafortolkning

Bemærk: Alle brønde bør behandles med den samme koncentration af bærestoffet.

— Såfremt det ukendte kemikalies agonistaktivitet IKKE påvirkes af behandlingen med ER-antagonist, klassificeres det som "negativt".

— Såfremt det ukendte kemikalies agonistaktivitet hæmmes fuldstændigt, anvendes beslutningskriterierne.

— Såfremt agonistaktiviteten ved den laveste koncentration svarer til eller overstiger PC10-responsen, er det ukendte kemikalie hæmmet i en grad, der svarer til eller overstiger PC10-responsen. Forskellen i respons mellem de brønde, der er behandlet, og de brønde, der ikke er behandlet med ER-antagonist, beregnes, og denne forskel anses for at være den korrekte respons og bør anvendes til beregning af de rette parametre, som gør det muligt at træffe en klassificeringsafgørelse.

Dataanalyse

Kontrollér standarden for ydeevne.

Kontrollér CV mellem brønde, som er behandlet under de samme betingelser.

1. Beregn gennemsnittet af VC.

2. Fratræk gennemsnittet af VC fra værdien af hver brønd, som **ikke** er behandlet med OHT.

3. Beregn gennemsnittet af OHT.

4. Fratræk gennemsnittet af VC fra værdien af hver brønd, som er behandlet med OHT.

5. Beregn gennemsnittet af PC.

6. Beregn den relative transkriptionsaktivitet for alle øvrige brønde i forhold til PC.

▼M8

Tillæg 2.2

FREMSTILLING AF SERUM BEHANDLET MED DEXTRANOVERTRUKKET TRÆKUL (DCC)

1. Behandlingen af serum med dextranovertrukket trækul (DCC) er en almindelig metode til at fjerne østrogenforbindelser fra serum, som tilsættes cellemedium for at udelukke den afvigende respons, som er knyttet til resterende østrogen i serum. 500 ml føtalt kalveserum (FBS) kan behandles efter denne fremgangsmåde.

Komponenter

2. Der kræves følgende materialer og udstyr:

Materialer

aktivt kul

dextran

magnesiumchloridhexahydrat (MgCl2 6H2O)

saccharose

1 M HEPES-bufferopløsning (pH 7,4)

ultrarent vand filtreret gennem et filtersystem

Udstyr

autoklaveret glasbeholder (størrelsen bør eventuelt tilpasses) almindelig laboratoriecentrifuge (hvor temperaturen kan sættes til 4 °C)

Fremgangsmåde

3. Den følgende fremgangsmåde er tilpasset til anvendelse af 50 ml centrifugerør:

[Dag 1] Fremstil dextranovertrukket kulsuspension med 1 l ultrarent vand indeholdende 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M saccharose, 2,5 g trækul, 0,25 g dextran og 5 mM HEPES, og omrør ved 4 °C natten over.

[Dag 2] Dispensér suspensionen i 50 ml centrifugerør, og centrifugér ved 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter. Fjern supernatanten, og opbevar halvdelen af kulsedimentet ved 4 °C til anvendelse på dag 3. Suspendér den anden halvdel af kullet med FBS, der er blevet optøet forsigtigt for at undgå bundfald og varmeinaktiveret ved 56 °C i 30 minutter, og overfør herefter til en autoklaveret glasbeholder som f.eks. en Erlenmeyerkolbe. Omrør denne suspension forsigtigt ved 4 °C natten over.

[Dag 3] Dispensér suspensionen med FBS i centrifugerør, og centrifugér med 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter. Indsaml FBS, og overfør til det nye kulsediment, der blev fremstillet og opbevaret på dag 2. Suspendér kulsedimentet, og omrør denne suspension forsigtigt i en autoklaveret glasbeholder ved 4 °C natten over.

[Dag 4] Dispensér suspensionen til centrifugering ved 10 000 o/min. ved 4 °C i 10 minutter, og sterilisér supernatanten ved filtrering gennem et 0,2 μm sterilt filter. Denne DCC-behandlede FBS bør opbevares ved -20 °C og kan bruges i op til et år.

▼**M8**

Tillæg 3

VM7LUC-ØSTROGENRECEPTOR-TRANSAKTIVERINGSASSAY TIL PÅVISNING AF ØSTROGENRECEPTORAGONISTER OG -ANTAGONISTER.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette assay anvender VM7Luc4E2-cellelinjen ([1]). Det er blevet valideret af National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) og Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). VM7Luc-cellelinjer angiver overvejende endogen ERα og en mindre mængde endogen ERβ (2) (3) (4).

2. Dette assay kan finde anvendelse på en lang række stoffer, forudsat at de kan opløses i dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5*)*, ikke reagerer med DMSO eller celledyrkningsmediet og ikke er cytotoksiske ved de testede koncentrationer. Hvis anvendelse af DMSO ikke er mulig, kan der anvendes et andet bærestof som ethanol eller vand (jf. punkt 12). Den påviste ydeevne for VM7Luc ER TA-(ant)agonistassayet tyder på, at de data, der genereres med dette assay, kan give oplysninger om ER-medierede virkningsmekanismer og kan tages i betragtning til prioritering af stoffer til yderligere test.

3. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hERα- og hERß-medieret TA ved at måle kemiluminescens som effektparameter. Anvendelsen af kemiluminescens i bioassays er udbredt, fordi luminescens har et højt forhold mellem signal og baggrund (10). Aktiviteten som følge af ildflueluciferase i cellebaserede assays kan imidlertid forveksles med stoffer, der hæmmer luciferaseenzymet og forårsage både tilsyneladende hæmning og øget luminescens på grund af proteinstabilisering (10). I nogle luciferasebaserede ER-reportergenassays er der endvidere rapporteret om ikke-receptormedierede luminescenssignaler ved højere fytoøstrogenkoncentrationer end 1 μM på grund af overaktivering af luciferasereportergenet (9) (11). Mens dosis/respons-kurven tyder på, at der sker en egentlig aktivering af ER-systemet ved lavere koncentrationer, skal den luciferaseekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller lignende kemiske forbindelser, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende overaktivering af luciferasereportergenet, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER TA-assaysystemer (see Appendix 2).

4. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

([1]) Før juni 2016 blev denne cellelinje betegnet som BG1Luc-cellelinje. BG-1-celler blev oprindelig beskrevet af Geisinger m.fl. (1998) (12) og blev senere karakteriseret af forskere ved National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). For relativt kort tid siden opdagede man, at der findes to varianter af BG-1-celler, som anvendes af forskere, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Tilbundsgående analyser, herunder DNA-test af disse to BG-1-variantcellelinjer udført af Li og medarbejdere (2014) (14), viste, at BG-1 Fr var unik, og at BG-1 NIEHS, dvs. den oprindelige cellelinje, der blev anvendt til at udvikle assayet, ikke var den humane BG1-ovariecarcinomcellelinje, men i stedet var en variant af den humane MCF7-brystcancercellelinje. Den cellelinje, som anvendes i assayet, og som oprindelig blev kaldt BG1Luc4E2 (15), vil nu blive betegnet VM7Luc4E2 ("V" = variant, "M7" = MCF7-celler). På samme måde vil assayet nu blive betegnet VM7Luc ER TA. Selv om dette ændrer oprindelsen af den cellelinje, assayet bygger på, påvirker det ikke offentliggjorte valideringsundersøgelser eller nytteværdien og anvendeligheden af dette assay til screening af østrogene/antiøstrogene kemikalier.

▼M8

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. Assayet benyttes til at angive ER-ligandbinding efterfulgt af kromosomtranslokation af receptorligandkomplekset til kernen. I kernen binder receptorligandkomplekset til specifikke DNA-responselementer og transaktiverer reportergenet (*luc*), hvorved der fremkommer luciferase og den efterfølgende udsendelse af lys, som kan kvantificeres ved hjælp af et luminometer. Luciferaseaktivitet kan vurderes hurtigt og billigt med forskellige typer testkit, der kan fås i handelen. VM7Luc ER TA anvender en ER-responsiv human brystadenocarcinomcellelinje, VM7, som er blevet stabilt transfekteret med en ildflue-*luc*-reporterkonstruktion under kontrol af fire østrogenresponselementer anbragt ovenfor mamatumorvirus-promoteren i mus (MMTV) for at opspore stoffer med in vitro-ER-agonistaktivitet eller -antagonistaktivitet. Denne MMTV-promoter udviser kun mindre krydsreaktivitet med andre steroide og ikke-steroide hormoner (8). Kriterier for datafortolkning er nærmere beskrevet i punkt 41. Kort beskrevet identificeres en positiv respons ved en koncentration/respons-kurve, som indeholder mindst tre punkter med ikke-overlappende fejltærskler (gennemsnit ± standardafvigelse) samt en ændring i amplitude (normaliseret relativ lysenhed [RLU]) på mindst 20 % af den maksimale værdi for referencestandarden (17β-østradiol [E2, CASRN 50-28-2] for agonistassayet, raloxifen HCl [Ral, CASRN 84 449-90-1]/E2 for antagonistassayet).

FREMGANGSMÅDE

Cellelinje

6. Den stabilt transfekterede VM7Luc4E2-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen er i øjeblikket kun tilgængelig med en teknisk licensaftale fra University of California, Davis, Californien, USA ([1]), og fra Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([2]).

Cellelinjens stabilitet

7. For at opretholde cellelinjens stabilitet og integritet bør cellerne dyrkes i mere end én generation fra den nedfrosne beholdning i celleopbevaringsmedium (jf. punkt 9). Celler bør ikke dyrkes i mere end 30 generationer. For VM7Luc4E2-cellelinjen vil 30 generationer være ca. tre måneder.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

8. De procedurer, der er anført i Guidance on Good Cell Culture Practice (5) (6), bør følges for at sikre kvaliteten af alle materialer og metoder med henblik på at bevare integriteten, validiteten og reproducerbarheden af det arbejde, der udføres.

9. VM7Luc4E2-celler opbevares i RPMI 1 640-medium suppleret med 0,9 % Pen-Strep og 8,0 % føtalt kalveserum (FBS) i en dedikeret vævsdyrkningsinkubator ved 37 ± 1 °C, 90 % ± 5 % fugtighed og 5,0 % ± 1 % CO_2/luft.

10. Når VM7Luc4E2-cellerne når op på ~80 % konfluens, bliver de dyrket i subkultur og konditioneres til et østrogenfrit miljø i 48 timer, før cellerne udplades i plader med 96 brønde til eksponering for testkemikalier og analyse af østrogenafhængig induktion af luciferaseaktivitet. Det østrogenfrie

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail: info@dioxins.com, telefon: +1 919-688-4804, fax: +1 919-688-4404.

▼M8

medium (EFM) Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) uden fenolrød suppleret med 4,5 % kul-/dextranbehandlet FBS, 1,9 % L-glutamin og 0,9 % Pen-Strep. Alt plastikudstyr skal være fri for østrogenaktivitet [se detaljeret protokol (7)].

Acceptkriterier

11. Godkendelse eller forkastelse af en test er baseret på vurdering af referencestandard og kontrolresultater fra hvert enkelt forsøg, der udføres på en plade med 96 brønde. Hver referencestandard testes i mange koncentrationer, og der er mange prøver af hver reference- og kontrolkoncentration. Resultaterne sammenlignes med kvalitetskontrollerfor de parametre, der er udledt af historiske agonist- og antagonistdatabaser, og som hvert laboratorium har genereret under påvisningen af laboratoriets kompetence. De historiske databaser ajourføres løbende med referencestandard og kontrolværdier. Ændringer i udstyr eller laboratoriebetingelser kan gøre det nødvendigt at generere ajourførte historiske databaser.

Agonisttest

Test til bestemmelse af dosisinterval

- Induktion: Pladeinduktion bør måles ved at dividere den gennemsnitligt højeste E2-referencestandard for relativ lysenhedsværdi (RLU) med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen. Der opnås normalt fem fold induktion, men med henblik på godkendelse bør induktionen være større end eller lig med fire fold.

- DMSO-kontrolresultater: RLU-værdierne for kontrolkulturen med opløsningsmiddel bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske kontrolkultur med opløsningsmiddel for den gennemsnitlige RLU-værdi.

- Forsøg, der ikke opfylder nogen af acceptkriterierne, bør kasseres og gentages.

Omfattende test

Den omfatter acceptkriterier fra testen til bestemmelse af agonist-dosisinterval og følgende:

- Referencestandardresultater: Referencestandarden for koncentration/respons-kurven for ER2 bør være sigmoidal i form og have mindst tre værdier inden for den lineære del af koncentration/respons-kurven.

- Positive kontrolresultater: RLU-værdierne for methoxychlorkontrollen bør være større end gennemsnittet for DMSO plus tre gange standardafvigelsen fra gennemsnittet for DMSO.

- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, bør kasseres og gentages.

Antagonisttest

Test til bestemmelse af dosisinterval

- Reduktion: Pladereduktion måles ved at dividere den gennemsnitligt højeste RLU-værdi for Ral/E2-referencestandarden med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen. Der opnås normalt fem fold reduktion, men med henblik på godkendelse bør reduktionen være større end eller lig med tre fold.

- E2-kontrolresultater: RLU-værdierne for E2-kontrollen bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske gennemsnitlige RLU-værdi for E2-kontrollen.

▼M8

- DMSO-kontrolresultater: RLU-værdierne for DMSO-kontrollen bør ligge inden for 2,5 gange standardafvigelsen for den historiske gennemsnitlige RLU-værdi for kontrolkulturen med opløsningsmiddel.

- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, kasseres og gentages.

Omfattende test

Den omfatter acceptkriterier fra testen til bestemmelse af antagonist-dosisinterval og følgende:

- Referencestandardresultater: Koncentration/respons-kurven for referencestandarden for Ral/E2 bør være sigmoidal i form og have mindst tre værdier inden for den lineære del af koncentration/respons-kurven.

- Positive kontrolresultater: RLU-værdier for tamoxifen/E2-kontrollen bør ligge under den gennemsnitlige E2-kontrol minus tre gange standardafvigelsen fra gennemsnittet for E2-kontrollen.

- Forsøg, der ikke opfylder et eneste acceptkriterium, kasseres og gentages.

Referencestandarder, positive kontroller og bærestofkontroller

Bærestofkontrol (agonist- og antagonistassays)

12. Det bærestof, der anvendes til at opløse testkemikalierne, bør testes som en bærestofkontrol. Det bærestof, der blev anvendt under valideringen af VM7Luc ER TA-assayet, var 1 % (v/v) dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (jf. punkt 24). Hvis der anvendes et andet bærestof end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof, hvis det er relevant.

Referencestandard (bestemmelse af agonist-dosisinterval)

13. Referencestandarden er E2 (CASRN 50-28-2). Til testen til bestemmelse af dosisinterval består referencestandarden af en seriel fortynding af fire koncentrationer af E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ og $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), idet hver koncentration testes i to brønde.

Referencestandard (agonist omfattende)

14. E2 til omfattende testning består af en seriel 1:2-fortynding bestående af 11 koncentrationer (fra $3{,}67 \times 10^{-10}$ til $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) E2 i to brønde.

Referencestandard (bestemmelse af antagonist-dosisinterval)

15. Referencestandarden er en kombination af Ral (CASRN 84 449-90-1) og E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 til testen til bestemmelse af dosisinterval består af en seriel fortynding af tre koncentrationer af Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ og $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) plus en fast koncentration ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) af E2 i to brønde.

Referencestandard (antagonist omfattende)

16. Ral/E2 til omfattende testning består af en seriel 1:2-fortynding af Ral (fra $2{,}45 \times 10^{-8}$ til $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) plus en fast koncentration ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2 bestående af ni koncentrationer af Ral/E2 i to brønde.

Svagt positiv kontrol (agonist)

17. Den svagt positive kontrol er $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor; CASRN 72-43-5) i EFM.

▼M8

Svagt positiv kontrol (antagonist)

18. Den svagt positive kontrol består af tamoxifen (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M med 9,18 × 10^{-11} M E2 i EFM.

E2-kontrol (antagonistassay alene)

19. E2-kontrol er 9,18 × 10^{-11} M E2 i EFM og anvendt som en negativ grundkontrol.

Foldinduktion (agonist)

20. Induktionen af luciferaseaktivitet i referencestandarden (E2) måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste E2-referencestandardværdi for RLU med den gennemsnitlige DMSO-kontrolværdi for RLU, og resultatet bør være større end fire fold.

Foldreduktion (antagonist)

21. Den gennemsnitlige luciferaseaktivitet for referencestandarden (Ral/E2) måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste RLU-værdi for Ral/E2-referencestandarden med den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen, som bør være større end tre fold.

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" for denne forsøgsmetode)

Bærestof

22. Testkemikalier bør opløses i et opløsningsmiddel, som opløser testkemikaliet og kan blandes med cellemediet. Vand, ethanol (95-100 % renhed) og DMSO er egnede bærestoffer. Hvis der anvendes DMSO, bør niveauet ikke overstige 1 % (v/v). For ethvert bærestof bør det påvises, at den maksimalt anvendte mængde ikke er cytotoksisk og ikke indvirker på assayets ydeevne. Referencestandarder og kontroller opløses i 100 % opløsningsmiddel og fortyndes herefter ned til passende koncentrationer i EFM.

Præparering af testkemikalier

23. Testkemikalier opløses i 100 % DMSO (eller et passende opløsningsmiddel) og fortyndes herefter ned til passende koncentrationer i EFM. Lad alle testkemikalier ækvilibrere til stuetemperatur, før de opløses og fortyndes. Testkemikalieopløsninger fremstilles frisk til hvert forsøg. Opløsningerne bør ikke have udtalt bundfald eller uklarhed. Lagre af referencestandarder og kontroller kan fremstilles i større mængder; dog bør den endelige referencestandard, kontrolfortyndinger og testkemikalier fremstilles frisk til hvert forsøg og anvendes inden for 24 timer efter fremstillingen.

Opløselighed og cytotoksisk effekt: Overvejelser vedrørende bestemmelse af dosisinterval

24. Test til bestemmelse af dosisinterval består af syv seriefortyndinger i forholdet 1:10 (dobbeltbestemmelse). Indledningsvis testes testkemikalierne op til højeste koncentration på 1 mg/ml (~1 mM) til agonisttest og 20 μg/ml (~10 μM) til antagonisttest. Forsøg til bestemmelse af dosisinterval benyttes til at fastlægge følgende:

— testkemikaliets startkoncentrationer, der anvendes under omfattende testning

— testkemikaliefortyndinger (1:2 eller 1:5), der anvendes under omfattende testning

▼M8

25. En vurdering af cellernes levedygtighed/cytotoksiske effekt er inkluderet i protokollerne for agonist- og antagonistassays (7) og er indarbejdet i test til bestemmelse af dosisinterval og omfattende test. Den cytotoksicitetsmetode, som blev benyttet til at vurdere cellernes levedygtighed under valideringen af VM7Luc ER TA (1), var en skaleret kvalitativ, visuel observationsmetode; der kan dog benyttes en kvantitativ metode til bestemmelse af den cytotoksiske effekt (jf. protokollen (7)). Data fra testkemikaliekoncentrationer, der forårsager over 20 % reduktion i levedygtighed, kan ikke anvendes.

Eksponering for testkemikaliet og organisering af assaypladen

26. Celler tælles og udplades i vævsdyrkningsplader med 96 brønde (2×10^5 celler pr. brønd) i EFM og inkuberes i 24 timer, så cellerne kan binde sig til pladen. EFM fjernes og erstattes med test- og referencekemikalier i EFM og inkuberes i 19-24 timer. Der skal tages særlige hensyn til meget flygtige stoffer, da tilstødende kontrolbrønde kan generere falsk positive resultater. I sådanne tilfælde anbefales "pladeforseglere", der kan bidrage til effektivt at isolere individuelle brønde under testningen.

Test til bestemmelse af dosisinterval

27. Ved bestemmelse af dosisinterval benyttes alle brønde i en plade med 96 brønde til at teste op til seks testkemikalier som syv seriefortyndinger i forholdet 1:10 (dobbeltbestemmelse) (jf. figur 1 og 2).

— Ved test til bestemmelse af *agonist*-dosisinterval anvendes fire koncentrationer af E2 (dobbeltbestemmelse) som referencestandard og fire replikatbrønde til DMSO-kontrollen.

— Ved test til bestemmelse af *antagonist*-dosisinterval anvendes tre koncentrationer af Ral/E2 med $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 (dobbeltbestemmelse) som referencestandard med tre replikatbrønde til E2- og DMSO-kontrollen.

Figur 1

Layout for en testplade med 96 brønde til bestemmelse af agonist-dosisinterval

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Forkortelser: E2-1 til E2-4 = koncentrationer af E2-referencestandard (fra høj til lav); TC1-1 til TC1-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 5 (TC5); TC6-1 til TC6-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 6 (TC6); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

▼M8

Figur 2

Layout for en testplade med 96 brønde til bestemmelse af antagonist-dosisinterval

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Forkortelser: E2 = E2-kontrol; Ral-1 til Ral-3 = koncentrationer af Raloxifen/E2-referencestandard (fra høj til lav); TC1-1 til TC1-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 5 (TC5); TC6-1 til TC6-7 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 6 (TC6); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

Bemærk: Alle testkemikalier testes med 9,18 × 10-11 M E2.

28. Den anbefalede endelige mængde medium, der kræves til hver brønd, er 200 µl. Brug kun testplader, hvor cellerne i alle brønde giver en levedygtighed på 80 % og derover.

29. Bestemmelse af startkoncentrationer til omfattende ***agonist***-testning er indgående beskrevet i agonistprotokollen (7). Kort forklaret anvendes følgende kriterier:

— Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger over middel plus tre gange DMSO-kontrollens standardafvigelse, udføres der omfattende testning under anvendelse af 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2 begyndende ved den maksimale opløselige koncentration.

— Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger over middel plus tre gange DMSO-kontrollens standardafvigelse, bør den startkoncentration, der skal anvendes i 11-punktsplanen for fortynding ved omfattende testning, være en log højere end den koncentration, som giver den højeste justerede RLU-værdi i bestemmelsen af dosisinterval. 11-punktsplanen for fortynding er baseret på fortyndinger i forholdet 1:2 eller 1:5 efter følgende kriterier:

Der bør anvendes 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2, hvis det deraf følgende koncentrationsområde vil omfatte hele responsområdet baseret på den koncentration/respons-kurve, der genereres i testen til bestemmelse af dosisinterval. Ellers bruges en 1:5-fortynding.

▼M8

— Hvis et testkemikalie udviser en bifasisk koncentration/respons-kurve i testen til bestemmelse af dosisinterval, opløses begge faser også i omfattende testning.

30. Bestemmelse af startkoncentrationer til omfattende ***antagonist***-testning er indgående beskrevet i antagonistprotokollen (7). Kort forklaret anvendes følgende kriterier:

— Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger under middel minus tre gange standardafvigelsen for E2-kontrollen, udføres der en omfattende testning under anvendelse af 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2 begyndende ved den maksimale opløselige koncentration.

— Hvis ingen punkter på testkemikaliets koncentrationskurve ligger under middel minus tre gange E2-kontrollens standardafvigelse, bør den startkoncentration, der skal anvendes i 11-punktsplanen for fortynding ved omfattende testning, være en af følgende:

• den koncentration, der giver den laveste justerede RLU-værdi ved bestemmelsen af dosisinterval

• den maksimale opløselige koncentration (jf. antagonistprotokollen (7), figur 14-2)

• den laveste cytotoksiske koncentration (jf. antagonistprotokollen (7), figur 14-3 for et beslægtet eksempel).

— 11-punktsplanen for fortynding er baseret på enten en seriefortynding i forholdet 1:2 eller 1:5 efter følgende kriterier:

Der bør anvendes 11 seriefortyndinger i forholdet 1:2, hvis det deraf følgende koncentrationsområde vil omfatte hele responsområdet baseret på den koncentration/respons-kurve, der genereres i testen til bestemmelse af dosisinterval. Ellers anvendes en 1:5-fortynding.

Omfattende test

31. Omfattende testning består af 11 seriefortyndinger (seriefortyndinger i forholdet 1:2 eller 1:5 baseret på startkoncentrationer for omfattende testkriterier), idet hver koncentration testes i tredobbelte brønde på pladen med 96 brønde (jf. figur 3 og 4).

— Ved omfattende *agonist*-testning anvendes 11 koncentrationer af E2 (dobbeltbestemmelse) som referencestandard. Fire replikatbrønde til DMSO-kontrol og fire replikatbrønde til methoxychlor-kontrol (9,06 x 10^{-6} M) medtages på hver plade.

— Ved omfattende *antagonist*-testning anvendes ni koncentrationer af Ral/E2 med 9,18 × 10^{-11} M E2 (dobbeltbestemmelse) som referencestandard med fire replikatbrønde til E2 9,18 x 10^{-11} M kontrol, fire replikatbrønde til DMSO-kontrol og fire replikatbrønde til tamoxifen 3,36 x 10^{-6} M.

▼M8

Figur 3

Layout for en testplade med 96 brønde til omfattende agonisttest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Forkortelser: TC1-1 til TC1-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1; TC2-1 til TC2-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2; E2-1 til E2-11 = koncentrationer af E2-referencestandard (fra høj til lav); Meth = p,p' methoxychlor svagt positiv kontrol; VC = bærestofkontrol (DMSO, 1 % (v/v) EFM).

Figur 4

Layout for en plade med 96 brønde til omfattende agonisttest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Forkortelser: E2 = E2-kontrol; Ral-1 til Ral-9 = koncentrationer af raloxifen/E2-referencestandard (fra høj til lav); Tam = tamoxifen/E2 svagt positiv kontrol; TC1-1 til TC1-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 1 (TC1); TC2-1 til TC2-11 = koncentrationer (fra høj til lav) af testkemikalie 2 (TC2); VC = bærestofkontrol (DMSO [1 % (v/v) EFM.]).

Bemærk: Som anført indeholder alle reference- og testbrønde en fast koncentration af E2 (9,18 x 10-11 M)

32. Gentagne omfattende test for det samme kemikalie udføres på forskellige dage for at sikre uafhængighed. Der bør foretages mindst to omfattende test. Hvis testresultaterne modsiger hinanden (f.eks. én test er positiv, den anden er negativ), eller hvis én af testene er utilstrækkelig, udføres der en tredje supplerende test.

Måling af luminescens

33. Luminescens måles i området 300-650 nm ved hjælp af et injektionsluminometer og med software, som kontrollere injektionsvolumen og måleinterval (7). Lysemission fra hver brønd angives som RLU pr. brønd.

▼M8

ANALYSE AF DATA

Bestemmelse af EC_{50} /IC_{50}

34. EC_{50}-værdien (halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et testkemikalie [agonister]) og IC_{50}-værdien (halvdelen af den maksimale inhiberende koncentration af et testkemikalie [antagonister]) bestemmes ud fra koncentration/respons-data. For testkemikalier, der er positive ved en eller flere koncentrationer, beregnes den koncentration af testkemikaliet, som forårsager en respons på halvdelen af det maksimale (IC_{50} eller EC_{50}) ved hjælp af en Hill-funktionsanalyse eller et passende alternativ. Hill-funktionen er en logistisk matematisk model med fire parametre, som knytter testkemikaliekoncentrationen til responsen (typisk efter en sigmoidal kurve) ved hjælp af nedenstående ligning:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

hvor:

Y = respons (dvs RLU'er)

X = logaritmen af koncentrationen

Bund = minimumrespons

Top = maksimumrespons

lg EC_{50} (eller lg IC_{50}) = logaritmen af X som responsen midtvejs mellem top og bund

Hills kurve = kurvens stejlhed.

Modellen beregner den bedste tilpasning for parametrene top, bund, Hills kurve samt IC_{50} og EC_{50}. Til beregning af EC_{50} og IC_{50}-værdier bør der anvendes passende statistisk software (f.eks. Graphpad Prism®).

Bestemmelse af afvigende værdier (outliers)

35. En god statistisk bedømmelse kan lettes ved at medtage (men ikke nøjes med) Q-testen (jf. agonist- og antagonistprotokollerne (7) til bestemmelse af "ubrugelige" brønde, som vil blive udelukket fra dataanalysen.

36. For E2-referencestandardreplikater (prøvestørrelse på to) betragtes enhver justeret RLU-værdi til et replikat ved en given koncentration af E2 som en afvigende værdi, hvis dens værdi ligger mere end 20 % over eller under den justerede RLU-værdi for den pågældende koncentration i den historiske database.

Indsamling og justering af luminometerdata til testen til bestemmelse af dosisinterval

37. Rådata fra luminometeret overføres til en regnearkskabelon designet til assayet. Det bestemmes, om der er afvigende datapunkter, som skal fjernes. (Jf. Kriterier for accept af testen med hensyn til parametre, der bestemmes i analyserne.) Følgende beregninger bør foretages:

Agonist

Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO-bærestofkontrollen (VC).

Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

▼**M8**

Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (E2).

Trin 4 Beregn den gennemsnitlige EC_{50}-værdi for testkemikalierne.

Antagonist

Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.

Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldreduktion for referencestandarden (Ral/E2).

Trin 4 Beregn middelværdien for E2-referencestandarden.

Trin 5 Beregn den gennemsnitlige IC50-værdi for testkemikalierne.

Indsamling og justering af luminometerdata til omfattende test

38. Rådata fra luminometeret overføres til en regnearkskabelon designet til assayet. Det bestemmes, om der er afvigende datapunkter, som skal fjernes. (Jf. Kriterier for accept af testen med hensyn til parametre, der bestemmes i analyserne.) Følgende beregninger foretages:

Agonist

Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.

Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (E2).

Trin 4 Beregn den gennemsnitlige EC_{50}-værdi for E2 og testkemikalierne.

Trin 5 Beregn den gennemsnitlige justerede RLU-værdi for methoxychlor.

Antagonist

Trin 1 Beregn middelværdien for DMSO VC.

Trin 2 Træk middelværdien af DMSO VC fra hver brøndværdi for at normalisere dataene.

Trin 3 Beregn den gennemsnitlige foldinduktion for referencestandarden (Ral/E2).

Trin 4 Beregn den gennemsnitlige IC_{50}-værdi for Ral/E2 og testkemikalierne.

Trin 5 Beregn den gennemsnitlige justerede RLU-værdi for tamoxifen.

Trin 6 Beregn middelværdien for E2-referencestandarden.

▼M8

Kriterier for datafortolkning

39. VM7Luc ER TA er tænkt som en del af en "weight of evidence"-analyse, der skal bidrage til at prioritere stoffer til ED-testning in vivo. En del af denne prioriteringsprocedure er klassificeringen af testkemikaliet som positivt eller negativt i forbindelse med enten ER-agonist- eller ER-antagonistaktivitet. De positive og negative beslutningskriterier, der anvendes i VM7Luc ER TA-valideringsundersøgelsen, er beskrevet i tabel 1.

Tabel 1

Positive og negative beslutningskriterier

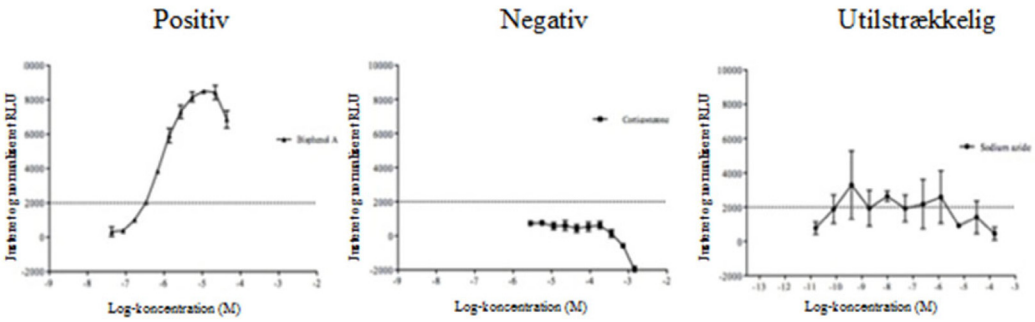
AGONISTAKTIVITET	
Positive	— Alle testkemikalier, der klassificeres som *positive for* ER-agonistaktivitet, bør have en koncentration/respons-kurve bestående af en basislinje efterfulgt af en positiv hældning, inden den ender i et plateau eller en top. I nogle tilfælde kan der kun defineres to af disse karakteristika (basislinje–hældning eller hældning–top). — Den linje, der definerer den positive hældning bør indeholde mindst tre punkter med ikke-overlappende fejlsøjler (gennemsnit ± standardafvigelse). Der ses bort fra de punkter, der danner basislinjen, men den lineære del af kurven kan omfatte toppen eller første punkt i plateauet. — En positiv klassificering kræver en responsamplitude, forskellen mellem basislinje og top, på mindst 20 % af den maksimale værdi for referencestandarden E2 (dvs. 2 000 RLU'er eller derover, når den maksimale responsværdi for referencestandarderne [E2] er justeret til 10 000 RLU'er). — Om muligt bør der beregnes en EC_{50}-værdi for hvert positivt testkemikalie.
Negative	Den gennemsnitlige justerede RLU for en given koncentration ligger på eller under den gennemsnitlige RLU-værdi for DMSO-kontrollen plus tre gange standardafvigelsen for DMSO RLU.
Utilstrækkelige	Data, der ikke kan fortolkes som valide til at vise enten tilstedeværelse eller fravær af aktivitet på grund af større kvalitative eller kvantitative begrænsninger, anses for at være utilstrækkelige og kan ikke bruges til at bestemme, om testkemikaliet er positivt eller negativt. Kemikalierne bør testes igen.
ANTAGONISTAKTIVITET	
Positive	— Ud fra testkemikaliedata genereres en koncentration/respons-kurve bestående af en basislinje, som efterfølges af en negativ hældning. — Den linje, der definerer den negative hældning, bør indeholde mindst tre punkter med ikke-overlappende fejlsøjler. Der ses bort fra de punkter, der danner basislinjen, men den lineære del af kurven kan omfatte det første punkt i plateauet. — Der bør mindst være en 20 % reduktion i aktiviteten i forhold til den maksimale værdi for referencestandarden Ral/E2 (dvs. 8 000 RLU eller derunder, når den maksimale responsværdi for referencestandarden [Ral/E2] justeres til 10 000 RLU'er). — De højeste ikke-cytotoksiske koncentrationer af testkemikaliet bør være under eller lig med $1x10^{-5}$ M. — Om muligt bør der beregnes en IC_{50}-værdi for hvert positivt testkemikalie.
Negative	Alle datapunkter ligger over EC_{80}-værdi (80 % af E2-responsen eller 8 000 RLU'er) ved koncentrationer under $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Utilstrækkelige	Data, der ikke kan fortolkes som valide til at vise enten tilstedeværelse eller fravær af aktivitet på grund af større kvalitative eller kvantitative begrænsninger, anses for at være utilstrækkelige og kan ikke bruges til at bestemme, om testkemikaliet er positivt eller negativt. Kemikaliet bør testes igen.

▼M8

40. Positive resultater vil om muligt blive karakteriseret ved både effektens størrelsesorden og den koncentration, hvor effekten opstår. Eksempler på positive, negative og utilstrækkelige data er vist i figur 5 og 6.

Figur 5

Agonisteksempler: positive, negative og utilstrækkelige data

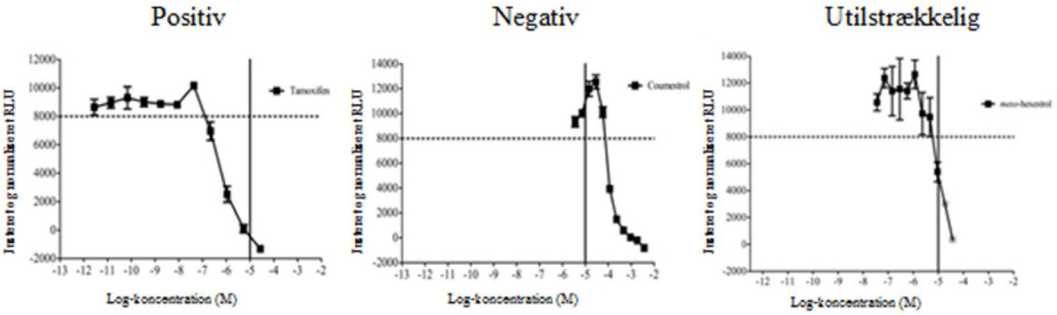


Den stiplede linje viser 20 % af E2-responsen, 2 000 justerede og normaliserede RLU'er.

Den stiplede linje viser 20 % af E2-responsen, 2 000 justerede og normaliserede RLU'er.

Figur 6

Antagonisteksempler: positive, negative og utilstrækkelige data



Den stiplede linje viser 80 % af Ral/E2-responsen, 8 000 justerede og normaliserede RLU'er.

Den ubrudte linje viser 1,00 x 10-5 M. For at blive anset for positiv bør en respons ligge under 8 000 RLU-linjen og ved koncentrationer under 1,00 x 10-5 M.

De koncentrationer, der er markeret med asterisk (*) på meso-hexestrol-grafen, viser levedygtighedsscorer på "2" eller derover.

Testresultater for meso-hexestrol anses for at være utilstrækkelige data, fordi den eneste respons under 8 000 RLU opstår ved 1,00 x 10-5 M.

41. Beregningerne af EC_{50} og IC_{50} kan foretages ved hjælp af en Hill-funktion med fire parametre (se agonistprotokollen og antagonistprotokollen for yderligere oplysninger (7)). Hvis acceptkriterierne opfyldes, viser det, at systemet fungerer korrekt, men det sikrer ikke, at enhver analyseserie vil producere nøjagtige data. Kan resultaterne af den første analyseserie gentages, er det den bedste garanti for, at der blev produceret nøjagtige data (jf. punkt 19 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER").

▼**M8**

TESTRAPPORT

42. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

LITTERATUR

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): s. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: s. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. og Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Tillæg 4

TRANSAKTIVERINGSASSAY MED STABILT TRANSFEKTERET HUMAN ØSTROGENRECEPTOR-A TIL PÅVISNING AF ØSTROGENAGONIST- OG ØSTROGENANTAGONISTAKTIVITET I KEMIKALIER, DER ANVENDER ERA CALUX-CELLELINJEN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. ERα CALUX-transaktiveringsassayet anvender den humane U2OS-cellelinje til at påvise østrogenagonist- og østrogenantagonistaktivitet medieret gennem human østrogenreceptor alfa (hERα). Valideringsundersøgelsen af bioassayet af det stabilt transfekterede ERα CALUX udført af BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederlandene) påviste relevansen og pålideligheden af assayet i overensstemmelse med dets formål (1). ERα CALUX-cellelinjen udtrykker stabilt transfekteret human ERα alene (2) (3).

2. Dette assay er specifikt udformet til at påvise hERα-medieret transaktivering ved at måle bioluminescens som effektparameter. Anvendelsen af bioluminescens benyttes almindeligvis i bioassays på grund af det høje forhold mellem signal og støj (4).

3. Det er rapporteret, at højere koncentrationer af fytoøstrogen end 1 μM har overaktiveret luciferasereportergenet, hvilket har medført ikke-receptormedieret luminescens (5) (6) (7). Derfor skal højere koncentrationer af fytoøstrogener eller andre lignende forbindelser, som kan overaktivere luciferaseekspression, undersøges nøje i stabilt transfekterede ER-transaktiveringsassays (jf. tillæg 2).

4. Afsnittene "GENEREL INDLEDNING" og "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" bør læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIP FOR ASSAYET (SE OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. Bioassayet benyttes til at vurdere ER-ligandbinding og efterfølgende kromosomtranslokation af receptorligandkomplekset til kernen. I kernen binder receptorligandkomplekset specifikke DNA-responselementer og transaktiverer et ildflue-luciferasereportergen, hvilket resulterer i øget cellulær ekspression af luciferaseenzymet. Efter tilsætningen af luciferasesubstratet luciferin omdannes luciferin til et bioluminescerende produkt. Det frembragte lys kan let påvises og kvantificeres ved hjælp af et luminometer.

6. Testsystemet anvender stabilt transfekterede ERα CALUX-celler. ERα CALUX-celler stammer fra den humane osteoblastiske osteosarkom-U2OS-cellelinje. Humane U2OS-celler blev stabilt transfekteret med 3xHRE-TATA-Luc og pSG5-neo-hERα under anvendelse af metoden til samtidig udfældning af calciumfosfat. U2OS-cellelinjen blev valgt som den cellelinje med den største modtagelighed for østrogen (og andre steroide hormoner) baseret på den observation, at U2OS-cellelinjen kun udviste ringe eller ingen endogen receptoraktivitet. Manglen på endogene receptorer blev alene vurderet ved hjælp af luciferase-reporterplasmider, som ikke viste nogen aktivitet ved tilsætning af receptorligander. Endvidere støttede denne cellelinje stærke hormonmedierede reaktioner, når der flygtigt indførtes beslægtede receptorer (2) (3) (8).

7. Test af kemikalier for østrogen- eller antiøstrogenaktivitet ved hjælp af ERα CALUX-cellelinjen omfatter en prescreening-analyseserie og omfattende analyseserier. Under prescreening-analyseserien bestemmes opløselighed, cytotoksisk effekt og et justeret koncentrationsområde for testkemikalier

▼M8

med henblik på omfattende testning. Under de omfattende analyseserier testes de justerede koncentrationsområder for testkemikalier i ERα CALUX-bioassays efterfulgt af klassificering af testkemikalierne for agonisme eller antagonisme.

8. Kriterier for datafortolkning er nærmere beskrevet i punkt 59. Kort fortalt anses et testkemikalie for at være positivt for agonisme, såfremt mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet viser en respons, som er lig med eller højere end 10 % af den maksimale respons for referencestandarden 17β-østradiol (PC_{10}). Et testkemikalie anses for at være positivt for antagonisme, såfremt mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet viser en respons, som er lig med eller lavere end 80 % af den maksimale respons for referencestandarden tamoxifen (PC_{80}).

FREMGANGSMÅDE

Cellelinjer

9. Den stabilt transfekterede U2OS ERα CALUX-cellelinje bør anvendes til assayet. Cellelinjen kan fås fra BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nederlandene med en teknisk licensaftale.

10. Der bør kun anvendes mykoplasmafrie cellekulturer. De cellebatcher, der anvendes, bør enten være certificeret negative for mykoplasmakontaminering, eller der bør foretages en mykoplasmatest før brug. RT-PCR (realtids-polymerasekædereaktion) bør anvendes til sensitiv påvisning af mykoplasmainfektion (9).

Cellelinjens stabilitet

11. For at bevare CALUX-cellernes stabilitet og integritet bør cellerne opbevares i flydende nitrogen (-80 °C). Efter optøning af cellerne med henblik på start af en ny kultur bør cellerne dyrkes i subkultur mindst to gange, før de anvendes til at vurdere kemikaliernes østrogene agonist- og antagonistaktivitet. Celler bør ikke dyrkes i subkultur i mere end 30 generationer.

12. For at overvåge cellelinjens stabilitet over tid bør det agonistiske og antagonistiske testsystems reaktionsevne kontrolleres ved at vurdere EC_{50}- eller IC_{50}-referencestandarden. Endvidere bør den relative induktion af den positive (PC) og negative kontrol (NC) overvåges. Resultaterne bør være i overensstemmelse med acceptkriterierne for det agonistiske (tabel 3C) eller antagonistiske ERα CALUX-bioassay (tabel 4C). Referencestandarder, positive og negative kontroller er anført i tabel 1 og tabel 2 for den henholdsvis agonistiske og antagonistiske måde.

Celledyrknings- og udpladningsbetingelser

13. U2OS-celler dyrkes i dyrkningsmedium (DMEM/F12 (1:1) med fenolrød som pH-indikator suppleret med føtalt kalveserum (7,5 %), ikke-essentielle aminosyrer (1 %), 10 enheder/ml penicillin, streptomycin og geneticin (G-418) som selektionsmarkør). Cellerne anbringes i en CO_2-inkubator (5 % CO_2) ved 37 °C og 100 % fugtighed. Når cellerne når en konfluens på 85-95 %, bør de enten dyrkes i subkultur eller forberedes til udsåning på mikrotiterplader med 96 brønde. I sidstnævnte tilfælde bør cellerne resuspenderes med $1x10^5$ celler/ml i østrogenfrit assaymedium (DMEM/F12 (1:1) medium uden fenolrød, suppleret med føtalt kalveserum behandlet med dextranovertrukket trækul (5 % (v/v)), ikke-essentielle aminosyrer (1 % (v/v)), 10 enheder/ml penicillin og streptomycin) og udplades i mikrotiterplader med 96 brønde (100 µl homogeniseret cellesuspension). Celler bør præinkuberes i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37^0C, 100 % fugtighed) i 24 timer forud for eksponeringen. Plastudstyr skal være østrogenfrit.

▼M8

Acceptkriterier

14. Agonist- og antagonistaktiviteter i testkemikaliet/-kemikalierne testes i testserier. En testserie består af maksimalt seks mikrotiterplader. Hver testserie indeholder mindst én fuld serie af opløsninger af en referencestandard, en positiv kontrol, en negativ kontrol og kontrolkulturer med opløsningsmiddel. Figur 1 og 2 viser pladeopstillingen for agonist- og antagonist-testserier.

15. Der bør foretages tredobbelt analyse af hver fortynding af referencestandarder, testkemikalier, alle kontrolkulturer med opløsningsmiddel samt positive og negative kontroller. Hver af de tredobbelte analyser skal opfylde kravene i tabel 3A og tabel 4A.

16. En fuldstændig serie af fortyndinger af referencestandarden (17β-østradiol for agonisme, tamoxifen for antagonisme) måles på den første plade i hver testserie. For at kunne sammenligne analyseresultaterne for de resterende fem mikrotiterplader med den første mikrotiterplade, som indeholder den fuldstændige koncentration/respons-kurve for referencestandarden, skal alle plader indeholde tre kontroller: kontrolkultur med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af den testede referencestandard og referencestandardens omtrentlige EC_{50}- (agonisme) eller IC_{50}- (antagonisme) koncentration. Forholdet mellem de gennemsnitlige kontroller på den første plade og de resterende fem plader bør opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

17. For hver af mikrotiterpladerne inden for en testserie beregnes z-faktoren (10). z-faktoren beregnes ved hjælp af reaktionerne ved den højeste og den laveste koncentration af referencestandarden. En mikrotiterplade anses for gyldig, såfremt den opfylder kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

18. Referencestandarden bør påvise en sigmoidal dosis/respons-kurve. EC_{50} eller IC_{50} udledt af responsen fra serien af fortyndinger af referencestandarden skal opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

19. Hver testserie bør indeholde en positiv og en negativ kontrol. Den beregnede relative induktion af både den positive og negative kontrol bør opfylde kravene i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

20. Under alle målinger bør induktionsfaktoren for den højeste koncentration af referencestandarden måles ved at dividere den gennemsnitlige højeste relative lysenhedsrespons (RLU) for referencestandarden 17β-østradiol med den gennemsnitlige RLU-respons for referencekontrolkulturen med opløsningsmiddel. Denne induktionsfaktor skal opfylde mindstekravene til foldinduktionen som anført i tabel 3C (agonisme) eller tabel 4C (antagonisme).

21. Kun mikrotiterplader, der opfylder alle de ovennævnte acceptkriterier, betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere responsen af testkemikalierne.

22. Acceptkriterierne finder anvendelse på både prescreening-analyseserie og omfattende analyseserier.

▼M8

Tabel 1

Koncentrationer af referencestandard, positiv kontrol (PC) og negativ kontrol (NC) for det agonistiske CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Måleområde (M)
Referencestandard	17β-østradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Positiv kontrol (PC)	17α-methyltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negativ kontrol (NC)	corticosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabel 2

Koncentrationer af referencestandard, positiv kontrol (PC) og negativ kontrol (NC) for det antagonistiske CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Måleområde (M)
Referencestandard	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Positiv kontrol (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negativ kontrol (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabel 3

Acceptkriterier for det agonistiske ERα CALUX-bioassay

A – individuelle prøver på en plade		**Kriterium**
1	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til NC, PC, hver fortynding af testkemikaliet og referencestandarden, undtagen C0)	< 15 %
2	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard og testkemikalie (C0, SC))	< 30 %
3	Maksimal LDH-udsivning som et mål for cytotoksisk effekt.	< 120 %
B - inden for en enkelt mikrotiterplade		
4	Forholdet mellem kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden (C0, plade 1) og kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikaliet (SC, plade 2 til x)	0,5 til 2,0
5	Forholdet mellem den omtrentlige EC50 og højeste referencestandardkoncentrationer på plade 1 og den omtrentlige EC50 og højeste referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C4, C8)	0,70 til 1,30
6	Z-faktor for hver plade	> 0,6
C - inden for en enkelt analyseserie (alle plader inden for én serie)		
7	Sigmoidal kurve for referencestandarden	Ja (17ß-østradiol)
8	EC50-niveau for referencestandard 17ß-østradiol	4*10-12 – 4*10-11 M
9	Minimumsfoldinduktion for den højeste koncentration af 17ß-østradiol i forhold til kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden.	5
10	Relativ induktion (%) PC	> 30 %
11	Relativ induktion (%) NC	< 10 %

▼M8

Omtr.: omtrentlig, PC: positiv kontrol, NC: negativ kontrol, SC: kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie, C0: kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard, Standardafvigelse: standardafvigelse, LDH: laktatdehydrogenase.

Tabel 4

Acceptkriterier for det antagonistiske ERα CALUX-bioassay

A – individuelle prøver på en plade		**Kriterium**
1	Maksimal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til NC, PC, hver fortynding af testkemikaliet og referencestandarden, kontrolkultur med opløsningsmiddel (C0))	< 15 %
2	Maximal procentvis standardafvigelse for tredobbelte brønde (til bærestofkontrol (VC) og højeste referencestandardkoncentration (C8))	< 30 %
3	Maksimal LDH-udsivning som et mål for cytotoksisk effekt.	< 120 %
B - inden for en enkelt mikrotiterplade		
4	Forholdet mellem kontrolkulturen med opløsningsmiddel for referencestandarden (C0, plade 1) og kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikaliet (SC, plade 2 til x)	0,70 til 1,30
5	Forholdet mellem den omtrentlige IC50-referencestandardkoncentrationer på plade 1 og de omtr. IC50-referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C4)	0,70 til 1,30
6	Forholdet mellem de højeste referencestandardkoncentrationer på plade 1 og de højeste referencestandardkoncentrationer på plade 2 til x (C8)	0,50 til 2,0
7	Z-faktor for hver plade	> 0,6
C - inden for en enkelt analyseserie (alle plader inden for én serie)		
8	Sigmoidal kurve for referencestandarden	Ja (tamoxifen)
9	IC50-niveau for referencestandard (tamoxifen)	1*10-8 - 1*10-7 M
10	Minimumsfoldinduktion for kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandarden i forhold til den højeste koncentration af tamoxifen	2,5
11	Relativ induktion (%) PC	< 70 %
12	Relativ induktion (%) NC	> 85 %

Omtr.: omtrentlig, PC: positiv kontrol, NC: negativ kontrol, VC: bærestofkontrol (kontrolkultur med opløsningsmiddel uden fast koncentration af agonistreferencestandard), SC: kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie, C0: kontrolkultur med opløsningsmiddel for referencestandard, Standardafvigelse: standardafvigelse, LDH: laktatdehydrogenase.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel/bærestof, referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller

23. For både prescreening-analyseserien og de omfattende analyseserier bør der anvendes den samme kontrolkultur med opløsningsmiddel/bærestof og de samme referencestandarder, positive kontroller og negative kontroller. Endvidere bør koncentrationen for referencestandarder, positive kontroller og negative kontroller være de samme.

▼**M8**

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

24. Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikalierne, bør testes som en kontrolkultur med opløsningsmiddel. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CASRN 67-68-5) blev anvendt som bærestof under valideringen af ERα CALUX-bioassayet. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof. Bemærk, at kontrolkulturen med opløsningsmiddel til antagonistiske undersøgelser indeholder en fast koncentration af agonistreferencestandarden 17β-østradiol (omtrentlig EC_{50}-koncentration). Til test af det opløsningsmiddel, der skal anvendes til antagonistiske undersøgelser, fremstilles og testes en bærestofkontrol.

Bærestofkontrol (antagonisme)

25. Til test for antagonisme suppleres assaymediet med en fast koncentration af agonistreferencestandarden 17β-østradiol (omtrentlig EC_{50}-koncentration). Til test af det opløsningsmiddel, som anvendes til at opløse testkemikalierne for antagonisme, fremstilles et assaymedium uden en fast koncentration af agonistreferencestandarden 17β-østradiol. Denne kontrol anføres som bærestofkontrol. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CASRN 67-68-5) blev anvendt som bærestof under valideringen af ERα CALUX-bioassayet. Hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end DMSO, testes alle referencestandarder, kontroller og testkemikalier i det samme bærestof.

Referencestandarder

26. Den agonistiske referencestandard er 17β-østradiol (tabel 1). Referencestandarderne omfatter en række fortyndinger med otte koncentrationer af 17β-østradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Den antagonistiske referencestandard er tamoxifen (tabel 2). Referencestandarderne omfatter en række fortyndinger med otte koncentrationer af tamoxifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Hver af koncentrationerne af den antagonistiske referencestandard inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17β-østradiol ($3*10^{-12}$ M).

Positiv kontrol

28. Den positive kontrol for agonistiske undersøgelser er 17α-methyltestosteron (tabel 1).

29. Den positive kontrol for antagonistiske undersøgelser er 4-hydroxytamoxifen (tabel 2). Den antagonistiske positive kontrol inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17β-østradiol ($3*10^{-12}$ M).

Negativ kontrol

30. Den negative kontrol for agonistiske undersøgelser er corticosteron (tabel 1).

31. Den negative kontrol for antagonistiske undersøgelser er resveratrol (tabel 2). Den negative kontrol inkuberes sammen med en fast koncentration af den agonistiske referencestandard 17β-østradiol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Påvisning af laboratoriets kompetence (jf. punkt 14 og tabel 3 og 4 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER" for denne forsøgsmetode)

Bærestof

32. Det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikalier, skal opløse testkemikaliet fuldstændigt og skal kunne blandes med cellemediet. DMSO, vand og ethanol (95-100 % renhed) er egnede opløsningsmidler. Såfremt DMSO anvendes som opløsningsmiddel bør den maksimale koncentration af DMSO under inkubationen ikke overstige 1 % (v/v). Før brug testes opløsningsmidlet for manglende cytotoksisk effekt og interferens med assayets ydeevne.

Fremstilling af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier

33. Referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier opløses i 100 % DMSO (eller et egnet opløsningsmiddel). Egnede (serie-) fortyndinger fremstilles herefter i det samme opløsningsmiddel. Lad alle stoffer ækvilibrere til stuetemperatur, før de opløses. Frisk fremstillede stamopløsninger af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier bør ikke have udtalt bundfald eller uklarhed. Referencestandard- og kontrollagre kan fremstilles i større mængder. Stamopløsninger af testkemikalier fremstilles frisk før hvert forsøg. Endelige fortyndinger af referencestandarder, positive kontroller, negative kontroller og testkemikalier fremstilles frisk til hvert forsøg og anvendes inden for 24 timer efter fremstillingen.

Opløselighed, cytotoksisk effekt og bestemmelse af dosisinterval

34. Under prescreening-analyseserien bestemmes testkemikaliernes opløselighed i det valgte opløsningsmiddel. Der fremstilles en maksimum-stamkoncentration på 0,1 M. Såfremt denne koncentration giver opløselighedsproblemer, fremstilles der lavere stamopløsninger, indtil testkemikalierne er fuldt opløst. Under prescreening-analyseserien testes seriefortyndinger af testkemikaliet i forholdet 1:10. Den maksimale assaykoncentration til agonist- og antagonisttestning er 1 mM. Efter prescreeningen udledes et passende justeret koncentrationsområde til testkemikalier, som testes under de omfattende analyseserier. De opløsninger, der anvendes til omfattende testning, bør være 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x og 3000x.

35. Testning for cytotoksisk effekt er inkluderet i protokollen for agonist- og antagonistassays (11). Testning for cytotoksisk effekt er indarbejdet i både prescreening-analyseserien og i omfattende analyseserier. Den metode, som blev benyttet til at vurdere cytotoksisk effekt under valideringen af ERα CALUX-bioassayet, var udsivningstesten for laktatdehydrogenase (LDH) kombineret med kvalitativ visuel cellekontrol (jf. tillæg 4.1) efter eksponering for testkemikalier. Andre kvantitative metoder kan dog benyttes til bestemmelse af cytotoksisk effekt (f.eks. tetrazolium-baseret kolorimetrisk (MTT) assay eller cytotoksicitets-CALUX bioassay). Generelt betragtes testkemikaliekoncentrationer, der udviser mere end 20 % reduktion i cellernes levedygtighed, som cytotoksiske og kan derfor ikke anvendes til datavurdering. Med hensyn til LDH-udsivningsassayet betragtes koncentrationen af testkemikaliet som cytotoksisk, når den procentvise LDH-udsivning er højere end 120 %.

▼M8

Eksponering for testkemikalie og organisering af assaypladen

36. Efter trypsinering af en konfluerende kolbe med dyrkede celler genopslæmmes cellerne med $1x10^5$ celler/ml i østrogenfrit assaymedium. 100 µl genopslæmmede celler udplades i de inderste brønde på en mikrotiterplade med 96 brønde. De yderste brønde fyldes med 200 µl phosphatbufret fysiologisk saltopløsning (PBS) (jf. figur 1 og 2). De udpladede celler præinkuberes i 24 timer i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % fugtighed).

37. Efter præinkubation kontrolleres pladerne for visuel cytotoksisk effekt (jf. tillæg 4.1), kontaminering og konfluens. Kun plader, som ikke udviser visuel cytotoksisk effekt og kontaminering og har en konfluens på minimum 85 %, anvendes til test. Mediet fra de inderste brønde fjernes omhyggeligt og erstattes af 200 µl østrogenfrit assaymedium, som indeholder egnede fortyndingsserier af referencestandarder, testkemikalier, positive kontroller, negativekontroller og kontrolkulturer med opløsningsmiddel (tabel 5: agonistundersøgelser, Tabel 6: antagonistundersøgelser). Alle referencestandarder, testkemikalier, positive kontroller, negative kontroller og kontrolkulturer med opløsningsmiddel testes in triplo. I figur 1 angives pladelayoutet til agonisttestning. I figur 2 angives pladelayoutet til antagonisttestning. Pladelayoutet til prescreening-testning og omfattende testning er identisk. Til antagonisttestning indeholder alle inderste brønde undtagen brøndene til bærestofkontrol (VC) også en fast koncentration af agonistreferencestandard 17β-østradiol ($3*10^{-12}$ M). Bemærk, at referencestandarderne C8 og C4 tilsættes til hver TC-plade.

38. Efter eksponering af cellerne for alle kemikalier inkuberes mikrotiterpladerne med 96 brønde i endnu 24 timer i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % fugtighed).

Figur 1

Pladelayout for mikrotiterplader med 96 brønde til prescreening og vurdering af agonisteffekt.

Plade 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Efterfølgende plader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referencestandard-opløsningsmiddel

C(1-8) = fortyndingsserier (1-8, lave til høje koncentrationer) af referencestandarden

▼M8

PC = positiv kontrol

NC = negativ kontrol

TCx-(1-8) = fortyndinger (1-8, lave til høje koncentrationer) af testkemikalie til prescreening-analyseserie og vurdering af agonistisk effekt af testkemikalie x

SC = kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikaliet (optimalt det samme opløsningsmiddel som i C0, men eventuelt fra en anden batch).

Grå felter: = Yderste brønde fyldt op med 200 µl PBS.

Figur 2

Pladelayout for mikrotiterplader med 96 brønde til antagonistisk prescreening og vurdering af antagonistisk effekt.

Plade 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Efterfølgende plader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
H												

C0 = referencestandard-opløsningsmiddel

C(1-8) = fortyndingsserier (1-8, lave til høje koncentrationer) af referencestandarden

NC = negativ kontrol

PC = positiv kontrol

TCx-(1-8) = fortyndinger (1-8, lave til høje koncentrationer) af testkemikalie til prescreening-analyseserie og vurdering af agonistisk effekt af testkemikalie x

SC = kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikaliet (optimalt det samme opløsningsmiddel som i C0, men eventuelt fra en anden batch).

VC = bærestofkontrol (kontrolkultur med opløsningsmiddel uden fast koncentration af agonistreferencestandard 17β-østradiol).

Grå felter: = Yderste brønde fyldt op med 200 µl PBS.

Bemærk: Alle inderste brønde undtagen brøndene til bærestofkontrol (VC) indeholder også en fast koncentration af agonistreferencestandard 17β-østradiol (3,0*10-12 M).

Måling af luminescens

39. Måling af luminescens er nærmere beskrevet i agonist- og antagonistassayprotokollen (10). Dyrkningsmediet fra brøndene bør fjernes, og cellerne lyseres efterfulgt af 24 timers inkubation for at åbne cellemembranen, så luciferaseaktiviteten kan måles.

▼M8

40. Til måling af luminiscensen kræves et luminometer udstyret med to injektorer. Luciferasereaktionen startes med injektion af substratet luciferin. Reaktionen standes ved tilsætning af 0,2 M NaOH. Reaktionen standses for at forhindre, at der overføres luminescens fra én brønd til en anden.

41. Lys, der udsendes fra hver brønd, angives som relative lysenheder (RLU'er) pr. brønd.

Prescreening-analyseserie

42. Resultaterne af prescreening-analysen bruges til at bestemme et justeret koncentrationsområde for testkemikalier med henblik på omfattende testning. Vurderingen af resultaterne af prescreening-analysen og bestemmelsen af det justerede koncentrationsområde for testkemikalier med henblik på omfattende testning beskrives indgående i agonist- og antagonistassayprotokollen (10). Her anføres et kort resumé af procedurerne for bestemmelse af koncentrationsområdet for testkemikalier til agonist- og antagonisttestning. Jf. retningslinjer for udformning af seriefortynding i tabel 5 og 6.

Valg af koncentrationer til vurdering af agonistiske virkninger

43. Under prescreening-analyseserien testes testkemikalierne ved hjælp af serier af fortyndinger som anført i tabel 5 (agonisme) og 6 (antagonisme). Alle koncentrationer testes i tredobbelte brønde i overensstemmelse med pladelayoutet i figur 1 (agonisme) eller 2 (antagonisme).

44. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 3), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere responsen af testkemikalierne. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarden ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.

45. De indledende koncentrationsområder for testkemikalier bør justeres, og prescreening-analyseserien gentages, såfremt:

— der observeres cytotoksisk effekt. Prescreening-proceduren gentages med lavere ikke-cytotoksiske koncentrationer af testkemikaliet

— prescreeningen af testkemikaliet ikke udviser en fuld dosis/respons-kurve, fordi de testede koncentrationer genererer maksimal induktion. Prescreening-analyseserien gentages under anvendelse af lavere koncentrationer af testkemikaliet.

46. Når der observeres et gyldigt dosis/effekt-forhold, vælges den (laveste) koncentration, hvor der observeres maksimal induktion uden cytotoksisk effekt. Den højeste koncentration af det testkemikalie, som skal testes i omfattende analyseserier, bør være tre gange denne valgte koncentration.

47. En fuldstændig justeret fortyndingsserie med testkemikaliet fremstilles med fortyndingstrin som anført i tabel 5, idet der startes med den højeste koncentration som fastsat ovenfor.

▼M8

48. Et testkemikalie, som ikke fremkalder nogen agonistisk virkning, testes i omfattende analyseserier, der starter med den højeste ikke-cytotoksiske koncentration, som identificeres under prescreeningen.

Valg af koncentrationer til vurdering af antagonistiske virkninger

49. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 4), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere testkemikaliernes respons. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarden ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.

50. De indledende koncentrationsområder for testkemikalier bør justeres, og prescreening-analyseserien gentages, såfremt:

— der observeres cytotoksisk effekt. Prescreening-proceduren gentages med lavere ikke-cytotoksiske koncentrationer af testkemikaliet

— prescreeningen af testkemikaliet ikke udviser en fuld dosis/respons-kurve, fordi de testede koncentrationer genererer maksimal inhibering. Prescreeningen gentages under anvendelse af lavere koncentrationer af testkemikaliet.

51. Når der konstateres et gyldigt dosis/effekt-forhold, vælges den (laveste) koncentration, hvor der observeres maksimal inhibering uden cytotoksisk effekt. Den højeste koncentration af det testkemikalie, som skal testes i omfattende analyseserier, bør være tre gange denne valgte koncentration.

52. En fuldstændig justeret fortyndingsserie af testkemikaliet fremstilles med fortyndingstrin som anført i tabel 6, idet der startes med den højeste koncentration som bestemt ovenfor.

53. Testkemikalier, som ikke fremkalder nogen antagonistiske virkninger, testes i omfattende analyseserier, der starter med den højeste ikke-cytotoksiske koncentration, som er testet under prescreeningen.

Omfattende analyseserier

54. Efter valg af de justerede koncentrationsområder testes testkemikalierne grundigt ved hjælp af fortyndingsserierne i tabel 5 (agonisme) og 6 (antagonisme). Alle koncentrationer testes i tredobbelte brønde i overensstemmelse med pladelayoutet i figur 1 (agonisme) eller 2 (antagonisme).

55. Kun analyseresultater, der opfylder acceptkriterierne (tabel 3 og 4), betragtes som gyldige og kan anvendes til at vurdere testkemikaliernes respons. Såfremt en eller flere mikrotiterplader i analyseserien ikke opfylder acceptkriterierne, analyseres de pågældende mikrotiterplader igen. I tilfælde af at den første plade med den fuldstændige serie af fortyndinger af referencestandarden ikke opfylder acceptkriterierne, skal hele testserien (seks plader) analyseres igen.

▼**M8**

Tabel 5

Koncentration og fortyndinger af referencestandarder, kontroller og testkemikalier, som anvendes til agonist-testning

Reference-17β-østradiol		TCx – prescreening-analyseserie		TCx – omfattende analyseserie		Kontroller	
konc. (M)		fortynding		fortynding		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - testkemikalie x
PC - positiv kontrol (17α-methyltestosteron)
NC - negativ kontrol (corticosteron)
C0 - kontrolkultur med opløsningsmiddel efter referencestandard
SC - kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie

▼**M8**

Tabel 6

Koncentration og fortyndinger af referencestandarder, kontroller og testkemikalier, som anvendes til antagonisttestning

Referencetamoxifen		TCx – prescreening-analyseserie		TCx – omfattende analyseserie		Kontroller	
konc. (M)		fortynding		fortynding		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Suppleret agonist**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-østradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - testkemikalie x
PC - positiv kontrol (4-hydroxytamoxifen)
NC - negativ kontrol (resveratrol)
C0 - kontrolkultur med opløsningsmiddel efter referencestandard
SC - kontrolkultur med opløsningsmiddel for testkemikalie
VC - bærestofkontrol (indeholder ikke fast koncentration af agonistreferencestandarden 17β-østradiol ($3{,}0*10^{-12}$ M).

▼M8

Indsamling af data og dataanalyse

56. Efter prescreening og omfattende analyseserier bestemmes EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} og maksimal induktion ($TCx_{maks.}$) for et testkemikalie til agonistisk testning. Til antagonistisk testning beregnes IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} og minimumsinduktion ($TCx_{min.}$). I figur 3 (agonisme) og 4 (antagonisme) er disse parametre gengivet grafisk. De nødvendige parametre beregnes på grundlag af den relative induktion for hvert testkemikalie (i forhold til referencestandardens maksimale induktion (=100 %). Ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre) anvendes til vurdering af data i overensstemmelse med følgende ligning:

$$Y = Bottom + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope})}$$

hvor:

X = Logaritmen af dosis eller koncentration

Y = Respons (relativ induktion (%))

Top = Maksimumsinduktion (%)

Bund = minimumsinduktion (%)

$LogEC_{50}$ = Logaritmen af koncentrationen, hvor der observeres 50 % af den maksimale respons.

Hills kurve = hældningsfaktor eller Hills kurve

57. Rådata fra luminometeret angivet som relative lysenheder (RLU'er) overføres til det regneark til dataanalyse, som er udformet til prescreening og omfattende analyseserier. Rådata bør opfylde acceptkriterierne i tabel 3A og 3B (agonisme) eller 4A og 4B (antagonisme). Såfremt rådataene opfylder acceptkriterierne, udføres følgende beregningstrin for at bestemme de nødvendige parametre:

Agonisme

— Træk den gennemsnitlige RLU for kontrollen af referencestandarden med opløsningsmiddel fra hver af referencestandardernes råanalysedata.

— Træk den gennemsnitlige RLU for kontrolkulturen med opløsningsmiddel for testkemikaliet fra hver af testkemikaliernes råanalysedata.

— Beregn den relative induktion for hver koncentration af referencestandarden. Sæt induktionen for den højeste koncentration af referencestandarden til 100 %.

— Beregn den relative induktion for hver koncentration af testkemikaliet sammenlignet med den højeste koncentration af referencestandarden til 100 %.

— Vurder analyseresultaterne efter ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre).

▼**M8**

— Bestem EC_{50} og EC_{10} for referencestandarden.

— Bestem EC_{50} og EC_{10} for testkemikalierne.

— Bestem den relative maksimumsinduktion for testkemikaliet ($TC_{maks.}$).

— Bestem PC_{10} og PC_{50} for testkemikalierne.

For testkemikalier kan der ikke altid opnås en fuld dosis/respons-kurve, f.eks. på grund af cytotoksicitets- eller opløselighedsproblemer. Derfor kan EC_{50}, EC_{10} og PC_{50} ikke bestemmes. I så fald kan kun PC_{10} og $TC_{maks.}$ bestemmes.

Antagonisme

— Træk den gennemsnitlige RLU for den højeste referencestandardkoncentration fra hver af referencestandardernes råanalysedata.

— Træk den gennemsnitlige RLU for den højeste referencestandardkoncentration fra hver af testkemikaliernes råanalysedata.

— Beregn den relative induktion for hver koncentration af referencestandarden. Sæt induktionen for den laveste koncentration af referencestandarden til 100 %.

— Beregn den relative induktion for hver koncentration af testkemikaliet sammenlignet med den laveste koncentration af referencestandarden til 100 %.

— Vurder analyseresultaterne efter ikke-lineær regression (variabel hældning, 4 parametre).

— Bestem IC_{50} og IC_{20} for referencestandarden.

— Bestem IC_{50} og IC_{20} for testkemikalierne.

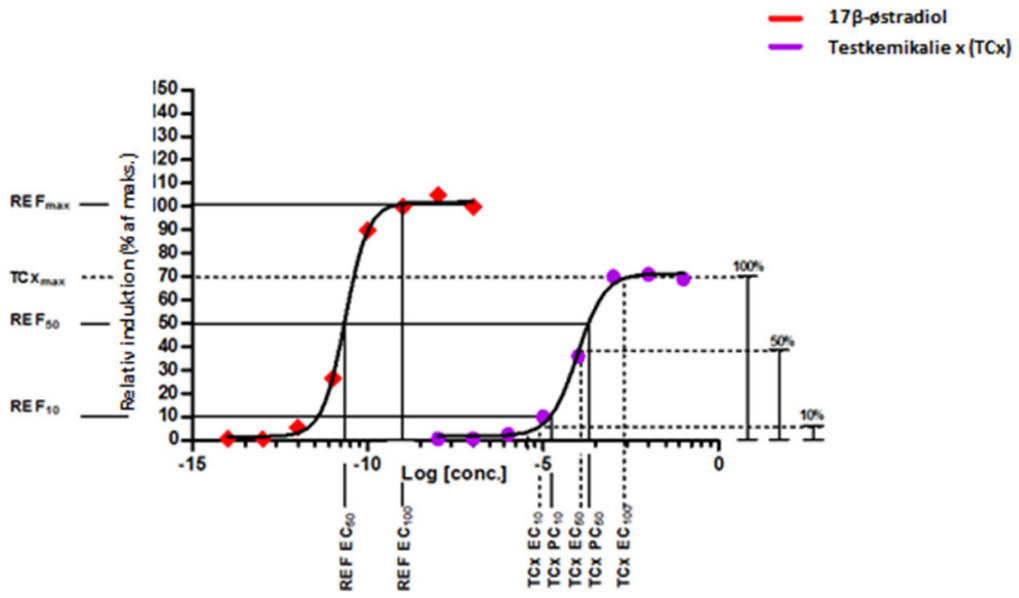
— Bestem den relative minimumsinduktion for testkemikaliet ($TC_{min.}$).

— Bestem PC_{80} og PC_{50} for testkemikalierne.

▼M8

Figur 3

Oversigt over parametre bestemt i agonistassayet



EC_{10} = koncentration af et stof, hvor der observeres 10 % af dets maksimale respons

EC_{50} = koncentration af et stof, hvor der observeres 50 % af dets maksimale respons

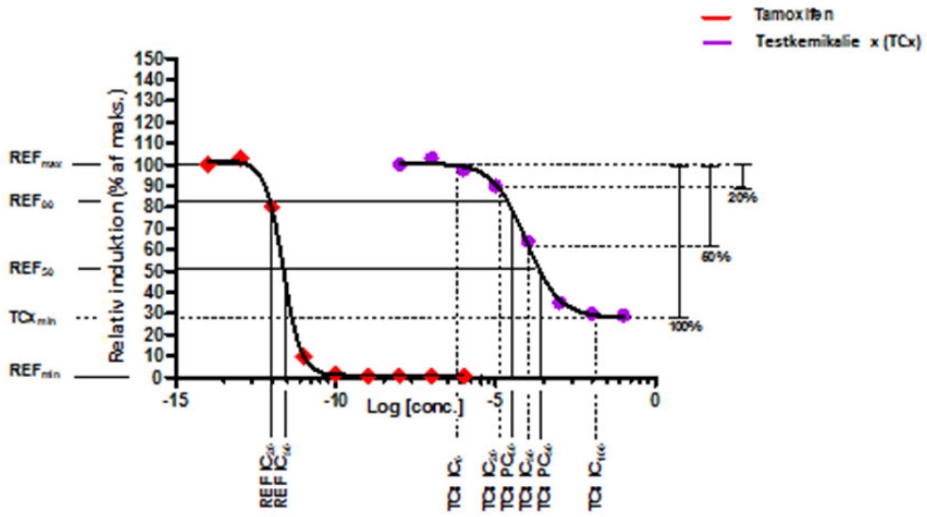
PC_{10} = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med EC_{10} af referencestandarden

PC_{50} = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med EC_{50} af referencestandarden.

$TCx_{maks.}$ = maksimal relativ induktion af testkemikalie.

Figur 4

Oversigt over parametre bestemt i antagonistassayet



IC20 = koncentration af et stof, hvor der observeres 80 % af dets maksimale respons (20 % inhibering).

▼M8

IC50 = koncentration af et stof, hvor der observeres 50 % af dets maksimale respons (50 % inhibering).

PC80 = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med IC20 af referencestandarden

PC50 = koncentration af et testkemikalie, hvis respons er lig med IC50 af referencestandarden

TCxmin. = relativ minimumsinduktion af testkemikalie.

For testkemikalier kan der ikke altid opnås en fuld dosis/respons-kurve, f.eks. på grund af cytotoksicitets- eller opløselighedsproblemer. Derfor kan IC_{50}, IC_{20} og PC_{50} ikke bestemmes. I så fald kan kun PC_{20} og $TC_{min.}$ bestemmes.

58. Resultaterne bør baseres på to (eller tre) uafhængige analyseserier. Hvis to analyseserier giver sammenlignelige og derfor reproducerbare resultater, er det ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. For at resultaterne kan godkendes, skal de:

— opfylde acceptkriterierne (se Acceptkriterier, punkt 14-22)

— kunne reproduceres.

Kriterier for datafortolkning

59. For at fortolke data og afgøre, om et testkemikalie anses for positivt eller negativt, anvendes følgende kriterier:

Agonisme

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **positivt**, såfremt:

1 $TC_{maks.}$ er lig med eller overstiger 10 % af referencestandardens maksimale respons (REF_{10}).

2 Mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller overstiger REF_{10}.

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **negativt**, såfremt:

1 TCmaks ikke overstiger 10 % af referencestandardens maksimale respons (REF10).

2 Under to koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller overstiger REF10.

Antagonisme

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **positivt**, såfremt:

1 TCmin. er lig med eller lavere end 80 % af referencestandardens maksimale respons (REF80 = 20 % inhibering).

2 Mindst to på hinanden følgende koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller lavere end REF80

▼**M8**

For hver omfattende analyseserie anses et testkemikalie for **negativt**, såfremt:

1 TCmin. overstiger 80 % af referencestandardens maksimale respons (REF80 = 20 % inhibering).

2 Under to koncentrationer af testkemikaliet er lig med eller lavere end REF80.

60. For at karakterisere styrken af et testkemikalies positive respons rapporteres virkningens omfang (agonisme: $TC_{maks.}$, antagonisme: $TC_{min.}$) og den koncentration, hvor virkningen opstår (agonisme: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}, antagonisme: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

TESTRAPPORT

61. Jf. punkt 20 i "ER TA-ASSAYETS KOMPONENTER".

LITTERATUR

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, og van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J og Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V og Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B og Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, og van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173-187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M og Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

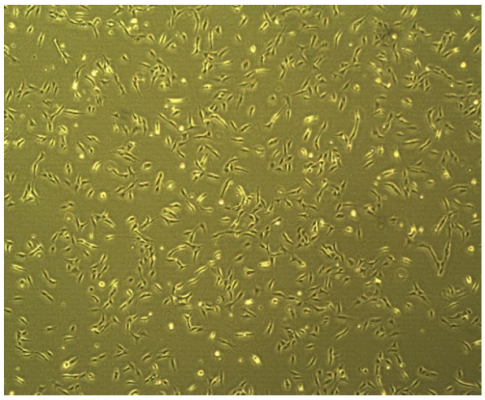
(10) Zhang J-H, Chung TDY, og Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73.

(11) Besselink H, Middelhof I, og Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederlandene.

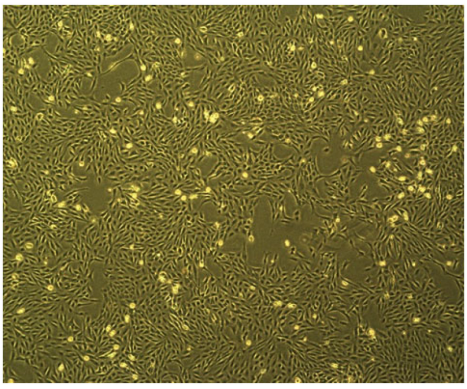
▼**M8**

Tillæg 4.1

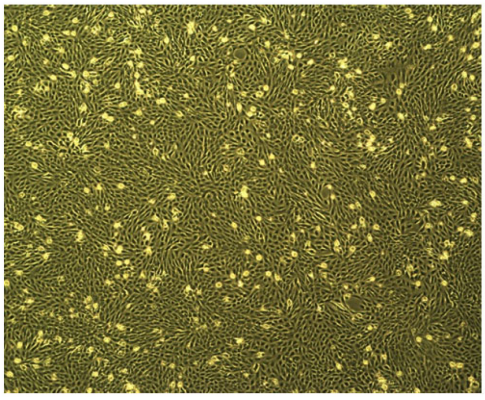
VISUEL KONTROL AF CELLELEVEDYGTIGHED



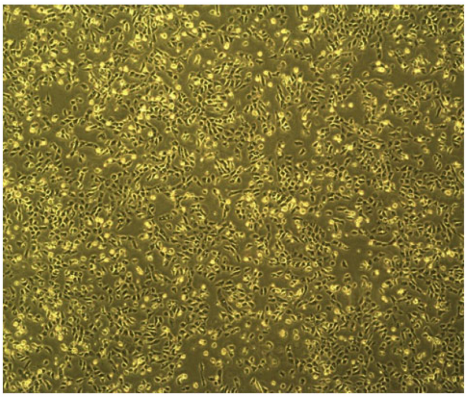
< 5 % konfluens. Celler er lige blevet podet. 100 % cellelevedygtighed. Klassificering: "ingen cytotoksisk effekt".



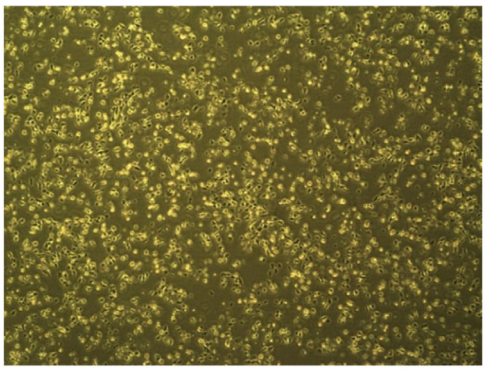
> 85 % konfluens. På dette stadium eksponeres celler for testkemikalier. > 95 % cellelevedygtighed.
Klassificering: "ingen cytotoksisk effekt".



> 95 % konfluens. Cellerne er tæt pakket og begynder at vokse abnormt. > 95 % cellelevedygtighed.
Klassificering: "ingen cytotoksisk effekt".



< 25 % cellelevedygtighed. Cellerne frigør sig, og kontakten mellem cellerne mindskes. Cellerne rundes. Klassificering: "cytotoksisk effekt".



< 5 % cellelevedygtighed. Cellerne frigør sig helt, og kontakten mellem cellerne brydes. Cellerne rundes. Klassificering: "cytotoksisk effekt".

▼M8

B.67. IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER VED ANVENDELSE AF THYMIDIN-KINASEGENET

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline) 490 (2016). Forsøgsmetoderne gennemgås regelmæssigt og revideres på baggrund af den videnskabelige udvikling, myndighedskrav og hensyn til dyrevelfærd. Muselymfomassayet (MLA) og TK6-testen ved anvendelse af thymidin-kinase-locus (TK) var oprindelig indeholdt i forsøgsmetode B.17. Efterfølgende har MLA-ekspertarbejdsgruppen under den internationale workshop for genotoksicitetstest (IWGT) udviklet internationalt harmoniserede anbefalinger vedrørende assayacceptkriterier og datafortolkning for MLA (1)(2)(3)(4)(5), og disse anbefalinger er indarbejdet i denne nye forsøgsmetode, B.67. Denne forsøgsmetode er skrevet til MLA, og fordi den også anvender TK locus, til TK6-testen. Mens MLA har fundet udbredt anvendelse til lovmæssige formål, anvendes TK6 langt mindre hyppigt. Det skal bemærkes, at de to cellelinjer til trods for ligheden mellem effektparametrene ikke er substituerbare, og at der i lovmæssige programmer kan være angivet en præference for den ene i forhold til den anden med henblik på en særlig lovmæssig anvendelse. F.eks. påviste valideringen af MLA, at den er hensigtsmæssig til påvisning ikke blot af genmutation, men også et testkemikalies evne til at fremkalde strukturel kromosombeskadigelse. Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. OECD har udarbejdet et dokument, som indeholder kortfattede oplysninger om testning for genetisk toksikologi, og en oversigt over de seneste ændringer af OECD's testvejledning om genetisk toksicitet (6).

2. Formålet med in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller er at påvise genmutationer, som induceres af kemikalier. De cellelinjer, der anvendes i disse test, måler fremadmutationer i reportergener, specifikt det endogene thymidin-kinasegen (*TK* for humane celler og *TK* for gnaverceller, under ét benævnt *TK* i denne forsøgsmetode). Denne forsøgsmetode er beregnet til brug med to cellelinjer: L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C muselymfomcellelinje (generelt benævnt L5178Y) og TK6 human lymphoblastoid cellelinje (generelt benævnt TK6). Skønt de to cellelinjer varierer på grund af deres oprindelse, cellevækst, p53-status, osv., kan der foretages *TK*-genmutationstest på samme måde i begge celletyper som beskrevet i denne forsøgsmetode.

3. Thymidin-kinasegenets autosomale og heterozygotiske karakter gør det muligt at påvise levedygtige kolonier, hvis celler mangler i enzymet thymidin-kinase efter mutation fra $TK^{+/-}$ til $TK^{-/-}$. Denne mangel kan skyldes genetiske hændelser, der påvirker *TK*-genet, herunder både genmutationer (punktmutationer, frameshift-mutationer, små deletioner osv.) og kromosomale hændelser (store deletioner, genomlejringer og mitotisk rekombination). Sidstnævnte hændelser angives som tab af heterozygoti, som er en almindelig genetisk forandring af anti-onkogener i human tumordannelse. Teoretisk kan tab af hele det *TK*-genbærende kromosom som følge af tensvækkelse og/eller mitotisk non-disjunction påvises i MLA. En kombination af cytogenetisk og molekylær analyse viser nemlig klart, at nogle MLA TK-mutanter er resultatet af non-disjunction. "Weight of evidence"-analysen viser imidlertid, at *TK*-genmutationstest ikke pålideligt kan påvise aneugener ved anvendelse af standardcytotoksicitetskriterier (som beskrevet i denne forsøgsmetode), og derfor er det ikke hensigtsmæssigt at anvende disse test til at påvise aneugener (7)(8)(9).

▼**M8**

4. I *TK*-genmutationstest genereres der to tydelige fænotypiske klasser af *TK*-mutanter: de normalt voksende mutanter, som vokser med samme hastighed som heterozygotiske TK-celler, og langsomt voksende mutanter, der vokser med længere fordoblingstider. De normalt voksende og langsomt voksende mutanter anerkendes som mutanter i både store og små kolonier i MLA og som mutanter i en tidligt fremkommen koloni og mutanter i en sent fremkommen koloni i TK6. Den molekylære og cytogenetiske karakter af MLA-mutanter i både store og små kolonier er blevet udforsket i detaljer (8)(10)(11)(12)(13). Den molekylære og cytogenetiske karakter af tidligt fremkomne og sent fremkomne TK6-mutanter er også blevet grundigt undersøgt (14)(15)(16)(17). Langsomt voksende mutanter for begge celletyper har lidt genetiske skader, der formentlig indebærer vækstregulerende gen(er) i nærheden af *TK*-locus, hvilket resulterer i længere fordoblingstider og dannelse af sent fremkomne eller små kolonier (18). Induktion af langsomt voksende mutanter er sat i forbindelse med kemikalier, som fremkalder større strukturelle ændringer på kromosomniveau. Celler, hvis skade ikke indebærer formodede vækstregulerende gener i nærheden af TK-locus, vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og bliver normalt voksende mutanter. Induktion af primært normalt voksende mutanter er sat i forbindelse med kemikalier, der primært fungerer som punktmutagener. Det er derfor væsentligt at tælle både langsomt voksende og normalt voksende mutanter med henblik på at genvinde alle mutanterne og skabe indsigt i, hvilke(n) type(r) skade (mutagener mod klastogener), testkemikaliet fremkalder (10)(12)(18)(19).

5. Forsøgsmetoden er organiseret, så den giver generelle oplysninger, som gælder for både MLA og TK6 samt specialiseret vejledning til individuelle test.

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

7. Normalt kræver en in vitro-test anvendelse af en kilde til eksogen metabolisk aktivering. Det eksogene metaboliske aktiveringssystem efterligner ikke *in vivo*-betingelserne fuldstændig.

8. Man bør omhyggeligt undgå betingelser, der kan føre til et artefakt positivt resultat (dvs. eventuel interaktion med testsystemet), der ikke skyldes interaktion mellem testkemikaliet og cellens genetiske materiale, men omfatter ændringer i pH eller osmolalitet, interaktion med mediets komponenter (20)(21) eller for højt cytotoksicitetsniveau (22)(23)(24). Et cytotoksicitetsniveau, der er højere end det højst anbefalede cytotoksicitetsniveau, jf. punkt 28, anses for at være for højt til MLA og TK6. Endvidere skal det bemærkes, at testkemikalier, som er thymidinanaloge eller har en adfærd som thymidinanaloge kan øge mutantfrekevensen gennem selektiv vækst af de spontane baggrundsmutanter under cellebehandling og kræver supplerende forsøgsmetoder for at sikre en tilstrækkelig vurdering (25).

9. For fremstillede nanomaterialer kan der være behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men disse er ikke beskrevet i forsøgsmetoden.

10. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

▼M8

11. Mutantceller, som mangler i thymidin-kinase-enzymaktiviteten på grund af en $TK^{+/-}$- til $TK^{-/-}$-mutation, er resistente over for de cytostatiske virkninger af den pyrimidinanaloge trifluorthymidin (TFT). Celler, som indeholder *TK*, er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT og danne synlige kolonier, mens celler, der indeholder TK-enzym, ikke kan.

PRINCIP FOR TESTEN

12. Celler i suspensionskultur eksponeres for testkemikaliet både med og uden eksogen metabolisk aktivering (se punkt 19) i et passende tidsrum (jf. punkt 33), hvorefter der ved dyrkning i subkultur bestemmes cytotoksisk effekt og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges. Cytotoksisk effekt bestemmes ved relativ total vækst (RTG – jf. punkt 25) for MLA og ved relativ overlevelse (RS – jf. punkt 26) for TK6. De behandlede kulturer bibeholdes så lang tid i dyrkningsmediet, afhængigt af hver celletype (jf. punkt 37), at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Efter fænotypeekspressionen bestemmes mutantfrekevensen ved udsåning af et kendt antal celler i et dyrkningsmedium med det selektive stof til påvisning af mutantkolonier og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af kloningseffektivitet (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutantfrekvensen beregnes ud fra antallet af mutantkolonier korrigeret for kloningseffektiviteten på tidspunktet for mutantudvælgelsen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Celler

13. For MLA: Da MLA blev udviklet og karakteriseret ved hjælp af underlinje $TK^{+/-}$ -3.7.2C af L5178Y-celler, skal denne specifikke underlinje anvendes til MLA. L5178Y-cellelinjen blev udledt af et methylcholanthren-induceret thymisk lymfom fra en DBA-2-mus (26). Clive behandlede sammen med sine medarbejdere L5178Y-celler (af Clivebetegnet som $TK^{+/+}$-3) med ethylmethansulfonat og isolerede en $TK^{-/-}$-klon (betegnet som $TK^{-/-}$-3,7) ved hjælp af bromdeoxyuridin som det selektive stof. Fra $TK^{-/-}$ klonen blev der isoleret og karakteriseret en spontan $TK^{+/-}$-klon (benævnt $TK^{+/-}$-3.7.2.) og en underklon (benævnt $TK^{+/-}$-3.7.2C) til brug i MLA (27). Karyotypen for cellelinjen er blevet offentliggjort (28)(29)(30)(31). Det normale kromosomtal er 40. Der er et metacentrisk kromosom (t12,13), som bør tælles som ét kromosom. Musens *TK*-locus ligger i blomsterenden af kromosom 11. L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C-cellelinjen har mutationer i begge p53-alleler og producerer mutant-p53 protein (32) (33). Testens evne til at påvise omfattende skade skyldes formentlig $TK^{+/-}$-3.7.2C-cellelinjens p53-status (17).

14. For TK6: TK6 er en human lymfoblastcellelinje. Modercellelinjen er en Epstein-Barr-virustransformeret cellelinje, WI-L2, som oprindelig blev udledt af en femårig dreng med arvelig spherocytose. Den første isolerede klon, HH4, blev mutageniseret med ICR191, og der blev genereret en *TK* heterozygotisk cellelinje, TK6, (34). TK6-celler er næsten diploide, og den repræsentative karyotype er 47, XY, 13+, t(14, 20), t(3, 21) (35). Det humane *TK*-locus ligger på den lange arm af kromosom 17. TK6 er en p53-kompetent cellelinje, fordi den har en vildtype p53-sekvens i begge alleler og kun udtrykker p53-protein af vildtypen (36).

▼M8

15. For både MLA og TK6 anbefales det, at forsøgslaboratoriet – når det første gang etablerer eller erstatter en stamkultur – sikrer sig, at der ikke er nogen *mykoplasma*-kontaminering, karyotyperer cellerne eller maler de kromosomer, som huser *TK*-locus, og kontrollerer populationens fordoblingstider. Den normale celledelingstid for celler, der anvendes i laboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber (16)(19)(37). Denne stamkultur opbevares ved -150 °C eller derunder og anvendes til at fremstille alle arbejdscellekulturer.

16. Enten forud for etablering af en lang række kryopræserverede arbejdskulturer eller lige før anvendelsen i et forsøg kan det være nødvendigt at rense kulturen for allerede eksisterende mutantceller [med mindre mutantfrekvensen (MF) i kontrolkulturen med opløsningsmiddel allerede ligger inden for det acceptable område – jf. tabel 2 med hensyn til MLA]. Dette opnås ved hjælp af methotrexat (aminopterin) til at fravælge celler, der mangler TK, og tilsætte thymidin, hypoxanthin og glycin (L5178Y) eller 2'-deoxycytidin (TK6) til kulturen for at sikre optimal vækst af de TK-kompetente celler (19)(38)(39), og (40) for TK6. Der kan findes generel rådgivning om god praksis for vedligeholdelse af cellekulturer samt specifik rådgivning for L5178Y- og TK6-celler i (19)(31)(37)(39)(41). For laboratorier, som har brug for stamcellekulturer til indledning af enten MLA eller TK6 eller ønsker nye stamcellekulturer, findes der et register over velkarakteriserede celler (37).

Medier og dyrkningsbetingelser

17. Til vedligeholdelse af kulturerne bør der til begge test anvendes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (f.eks. dyrkningsskåle, fugtig atmosfære på 5 % CO_2, inkubationstemperatur på 37 °C). Cellekulturer bør altid vedligeholdes under betingelser, der sikrer, at de vokser i logfase. Det er især vigtigt at vælge medier og dyrkningsbetingelser, som sikrer optimal cellevækst i ekspressionsperioden og under kloning for både mutantceller og ikke-mutantceller. For MLA og TK6 er det også vigtigt, at dyrkningsbetingelserne sikrer optimal vækst af både den store koloni/tidlige fremkomst og den lille koloni/sene fremkomst af TK-mutanter. Nærmere oplysninger om dyrkning, bl.a. behovet for at opvarme inaktivt hesteserum korrekt, hvis der anvendes RPMI-medium under mutantudvælgelsen, kan findes i (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Fremstilling af kulturer

18. Celler opformeres fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at suspensionskulturer vil fortsætte med at vokse eksponentielt i behandlings- og ekspressionsperioderne.

Metabolisk aktivering

19. Der bør anvendes eksogene metaboliserende systemer, når der gøres brug af L5178Y- og TK6-celler, fordi de har utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der anbefales som standard, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitochondriefraktion (S9), som fremstilles af levere fra gnavere (normalt rotter), der er behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (43)(44)(45) eller en blanding af phenobarbital og β-naphthoflavon (46)(47)(48)(49)(50)(51). Sidstnævnte blanding er ikke istrid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (52) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser

▼M8

med blandet funktion (45)(46)(47)(48)(49). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 %, men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Valget af type og koncentration af eksogent metabolisk aktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af gruppen af testkemikalier.

Præparering af testkemikaliet

20. Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 21). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. behandling i forseglede dyrkningsskåle (53)(54)(55). Testkemikaliet bør fremstilles lige inden behandlingen, medmindre det via stabilitetsdata påvises, at opbevaring er acceptabelt.

TESTBETINGELSER

Opløsningsmidler

21. Der vælges et opløsningsmiddel, der optimerer testkemikaliets opløselighed uden at påvirke testforløbet negativt, f.eks. i form af en ændring af cellevækst, påvirkning af testkemikaliets integritet, reaktion med dyrkningsskåle eller blokering af metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er vand eller dimethylsulfoxid. Organiske opløsningsmidler bør generelt ikke overstige 1 % (v/v), og vandige opløsningsmidler (fysiologisk saltopløsning eller vand) bør ikke overstige 10 % (v/v) i det færdige behandlingsmedium. Hvis der anvendes andet end ikke-veletablerede opløsningsmidler (f.eks. ethanol eller acetone), bør disse underbygges af data om deres kompatibilitet med testkemikalierne, testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Uden disse understøttende data er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (jf. tillæg 1, Definitioner) for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke forårsager skadevirkninger eller mutagene virkninger.

MÅLING AF CYTOTOKSISK EFFEKT OG VALG AF DOSISKONCENTRATIONER

22. Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør koncentrationer, der kan frembringe artefakt positiv respons, undgås, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksisk effekt (jf. punkt 28), udfældning i dyrkningsmediet (jf. punkt 29) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (jf. punkt 8). Hvis testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-værdien justeres ved bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå artefakt positive resultater og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

23. Valget af koncentration baseres på cytotoksisk effekt og andre overvejelser (jf. punkt 27-30). Evaluering af cytotoksisk effekt i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, men en indledende test er ikke påkrævet. Selv om der foretages en indledende vurdering af den cytotoksiske effekt, skal denne stadig måles i hovedforsøget for hver enkelt kultur. Hvis der udføres et forsøg til bestemmelse af dosisinterval, bør det dække en bred vifte af koncentrationer og kan enten afsluttes på dag 1 efter behandling eller gennemføres under den to dage lange ekspression og til mutantudvælgelsen (hvis det skulle vise sig, at de anvendte koncentrationer er egnede).

▼**M8**

24. Cytotoksisk effekt bør bestemmes for hver enkelt testkultur og kontrolkultur, idet metoder for MLA (2) og TK6 (15) defineres ved internationalt aftalt praksis.

25. For både agar- og mikrobrøndversionerne af MLA: Cytotoksisk effekt vurderes ved hjælp af relativ total vækst (RTG), som oprindelig blev defineret af Clive og Spector i 1975 (2). Dette mål omfatter den relative suspensionsvækst (RSG: testkultur over for kontrolkultur med opløsningsmiddel) under cellebehandlingen, ekspressionstiden og den relative kloningseffektivitet (RCE: testkultur over for kontrolkultur med opløsningsmiddel) på det tidspunkt, hvor der vælges mutanter (2). Det skal bemærkes, at RSG omfatter ethvert celletab, som opstår i testkulturen under behandling (jf. formlen i tillæg 2).

26. For TK6: Cytotoksisk effekt bør evalueres ved anvendelse af relativ overlevelse (RS), dvs. cellernes kloningseffektivitet, når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen baseret på celletal sammenholdt med den negative kontrol (med en overlevelsesprocent på 100) (jf. formlen i tillæg 2).

27. Mindst fire testkoncentrationer (bortset fra opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (egnet cytotoksisk effekt, antal celler mv.), bør vurderes. Selv om det anbefales at benytte dobbeltbestemmelse, kan der ved hver af de testede koncentrationer også anvendes replikate eller enkelte behandlede kulturer. De resultater, der opnås for replikate kulturer ved en given koncentration, bør rapporteres separat, men kan samles med henblik på dataanalyse (55). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoksisk effekt, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 fold normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoksisk effekt, bør de valgte koncentrationer dække et cytotoksicitetsområde fra det, der frembringer cytotoksisk effekt som beskrevet i punkt 28, til koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoksisk effekt. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at dække hele cytotoksicitetsområdet eller undersøge koncentration/respons-forholdet nærmere kan det være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og mere end fire koncentrationer, navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 70). Det kan være særligt vigtigt at bruge mere end fire koncentrationer, når der anvendes enkeltkulturer.

28. Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoksisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at nå mellem 20 og 10 % RTG for MLA og mellem 20 og 10 % RS for TK6 (punkt 67).

29. For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoksiske ved lavere koncentrationer end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller i et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliet. Selv om der forekommer cytotoksisk effekt over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun én koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Da der ved MLA og TK6 anvendes suspensionskulturer, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen. Det kan også være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

▼M8

30. Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoksisk effekt, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (57) (58). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning (UVCB'er)), miljømæssige udtræk mv., kan der være behov for at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoksisk effekt for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (59).

Kontroller

31. Der bør under alle forsøgsbetingelser indgå samtidige negative kontroller (jf. punkt 21), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.

32. Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise laboratoriets evne til at identificere mutagener i henhold til testprotokollen, påvise effektiviteten af det eksogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant, og i tilstrækkelig grad påvise både små/sent fremkomne og store/tidligt fremkomne *TK*-mutanter. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolstoffer kan anvendes, hvis der er belæg for det. Eftersom in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede til kortvarige behandlinger (3-4 timer), der udføres samtidig med og uden metabolisk aktivering af samme behandlingsvarighed, kan brugen af positive kontroller begrænses til en mutagenkrævende metabolisk aktivering. I dette tilfælde vil denne ene positive kontrolrespons påvise såvel aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet som testsystemets reaktionsevne. Anvendes der langtidsbehandling (dvs. 24 timer uden postmitochondrisk fraktion), bør den dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolisk aktivering. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed, og responsen bør ikke bringes i fare på grund af en cytotoksisk effekt, der overstiger grænserne i denne TM (jf. punkt 28).

Tabel 1

Anbefalede referencestoffer til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller

Kategori	Stof	CAS RN
1. Aktive mutagener uden metabolisk aktivering		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitroquinolin-N-oxid	56-57-5
2. Mutagener, som kræver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimethylbenzanthracen	57-97-6
	3-methylcholanthren	56-49-5

▼M8

FREMGANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

33. Celler under formering behandles med testkemikaliet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Eksponeringen skal vare et passende stykke tid (normalt er 3-4 timer passende). Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (59). I tilfælde, hvor kortvarig behandling med MLA giver negative resultater, og der foreligger oplysninger, som tyder på, at der er behov for længere behandling (f.eks. nukleosidanaloger, tungt opløselige kemikalier (5)(59)), bør det overvejes at udføre testen med længere behandling, dvs. 24 timer uden postmitochondrisk fraktion.

34. Det antal celler, der mindst skal anvendes til hver testkultur (kontrol og behandling) i hver enkelt testfase, bør baseres på den spontane mutantfrekvens. En generel vejledning er at behandle og opformere et tilstrækkeligt antal celler i hver forsøgskultur for at bevare mindst 10, men ideelt set 100, spontane mutanter i alle faser af testen (behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse (56).

35. For MLA ligger den anbefalede acceptable spontane mutantfrekvens mellem 35-140 $\times 10^{-6}$ (agarversion) og 50-170 $\times 10^{-6}$ (mikrobrøndversion) (jf. tabel 2). For at have mindst 10 og ideelt set 100 spontane mutanter, der overlever behandling for hver testkultur, er det nødvendigt at behandle mindst 6×10^6 celler. Behandling af dette antal celler og bibeholdelse af et tilstrækkeligt antal celler under ekspression og kloning til mutantudvægelse sikrer et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller derover) i alle faser af forsøget, selv for kulturer, som behandles ved koncentrationer, der resulterer i 90 % cytotoksisk effekt (som målt ved en RTG på 10 %) (19)(38)(39).

36. For TK6 ligger den spontane mutantfrekvens generelt mellem 2 og 10×10^{-6}. For at have mindst 10 spontane mutanter, der overlever behandling for hver kultur, er det nødvendigt at behandle mindst 20×10^6 celler. Behandling af dette antal celler giver et tilstrækkeligt antal spontane mutanter (10 eller derover), selv for kulturer behandlet ved koncentrationer, der forårsager 90 % cytotoksisk effekt under behandling (10 % RS). Endvidere skal der dyrkes et tilstrækkeligt antal celler i ekspressionsperioden, som udplades til mutantudvælgelse (60).

Fænotypeekspressionsperiode og måling af cytotoksisk effekt og mutantfrekvens

37. Ved afslutningen af behandlingsperioden dyrkes celler i en fastsat periode for at give mulighed for en næsten optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter, som er specifikke for hver enkelt cellelinje. For MLA varer fænotypeekspressionsperioden 2 dage. For TK6 varer fænotypeekspressionsperioden 3-4 dage. Hvis der anvendes en 24-timers behandling, begynder ekspressionsperioden efter behandlingens afslutning.

38. I fænotypeekspressionsperioden optælles cellerne dagligt. For MLA benyttes de daglige celletællinger til at beregne den daglige suspensionsvækst (SG). Efter den to dage lange ekspressionsperiode suspenderes cellerne i dyrkningsmedium med og uden selektivt stof med henblik på henholdsvis bestemmelse af antallet af mutanter (selektionsplader) og kloningseffektivitet (levedygtighedsplader). For MLA findes der to lige acceptable metoder til udvælgelse af mutanter til kloning: ved den ene anvendes agar, og ved den anden flydende vækstmedium på plader med 96 brønde (19)(38)(39). Kloning i TK6 udføres ved hjælp af flydende medier og plader med 96 brønde (16).

▼M8

39. Trifluorthymidin (TFT) er det eneste selektive stof, der anbefales til *TK*-mutanter (61).

40. For MLA tælles agarplader og mikrobrøndplader efter 10-12 dages inkubation. For TK6 registreres kolonier på mikrobrøndplader efter 10-14 dage for tidligt fremkomne mutanter. For at nyttiggøre de langsomt voksende (sent fremkomne) TK6-mutanter er det nødvendigt at fodre cellerne igen med dyrkningsmedium og TFT efter optælling af de tidligt fremkomne mutanter og herefter inkubere pladerne i yderligere 7-10 dage (62). Se punkt 42 og 44 for en diskussion af optællingen af langsomt og normalt voksende *TK*-mutanter.

41. De korrekte beregninger for de to test, herunder de to metoder (agar og mikrobrønd) til MLA, findes i tillæg 2. Til agarmetoden for MLA tælles kolonier, og antallet af mutantkolonier justeres ved kloningseffektiviteten for at beregne en MF. Til mikrobrøndversionen af MLA og TK6 bestemmes kloningseffektiviteten både for selektions- og kloningseffektivitetspladerne i overensstemmelse med Poisson-fordelingen (63). MF beregnes på grundlag af disse to kloningseffektiviteter.

Karakterisering af mutantkolonier

42. Hvis testkemikaliet for MLA er positivt (jf. punkt 62-63), udføres kolonikarakterisering ved bestemmelse af kolonistørrelse eller vækst i mindst én af testkulturerne (normalt den højeste acceptable positive koncentration) og i de negative og positive kontrolkulturer. Er testkemikaliet negativt (jf. punkt 64) udføres karakteriseringen af mutantkolonien i de negative og positive kontrolkulturer. Ved mikrobrøndmetoden for MLA defineres mutanter fra små kolonier som dem, der dækker under 25 % af brøndens diameter, og mutanter fra store kolonier som dem, der dækker over 25 % af brøndens diameter. Ved agarmetoden benyttes en automatisk kolonitæller til at optælle mutantkolonier og bestemme kolonistørrelse. Metoder til bestemmelse af kolonistørrelse er nærmere beskrevet i litteraturen (19)(38)(40). Karakterisering af kolonier på den negative og positive kontrol er nødvendig for at påvise, at undersøgelserne er foretaget korrekt.

43. Testkemikaliet kan ikke bestemmes til at være negativt, hvis mutanterne fra både de store og små kolonier ikke er tilstrækkeligt påvist i den positive kontrol. Karakterisering af kolonier kan give generelle oplysninger om testkemikaliets evne til at forårsage punktmutationer og/eller kromosomale hændelser (punkt 4).

44. TK6: Normalt voksende og langsomt voksende mutanter differentieres ved en forskel i inkubationstid (jf. punkt 40). For TK6 registreres både de tidligt og sent fremkomne mutanter for alle kulturerne, herunder de negative og positive kontroller. Kolonikarakterisering af den negative og positive kontrol er nødvendig for at påvise, at undersøgelserne foretages korrekt. Testkemikaliet kan ikke bestemmes til at være negativt, hvis både de tidligt fremkomne og sent fremkomne mutanter ikke er tilstrækkeligt påvist i den positive kontrolkultur. Karakterisering af kolonier kan give generelle oplysninger om testkemikaliets evne til at forårsage punktmutationer og/eller kromosomale hændelser (punkt 4).

▼M8

Laboratoriets kompetencer

45. For at påvise tilstrækkelig erfaring med testen, før den tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer (mindst et aktivt med og et aktivt uden metabolisk aktivering udvalgt blandt kemikalierne i tabel 1), og forskellige negative kontroller (herunder ubehandlede kulturer og forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 47-50. For MLA bør de værdier, som er opnået for både positive og negative kontroller, være i overensstemmelse med IWGT's anbefalinger (jf. tabel 2).

46. Et udvalg af positive kontrolstoffer (jf. tabel 1) bør undersøges med korte og lange behandlinger (hvis der benyttes lange behandlinger) uden metabolisk aktivering og også med kort behandling med metabolisk aktivering med henblik på at påvise evnen til at spore mutagene kemikalier, bestemme effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet og påvise cellevækstbetingelsernes egnethed under behandling, fænotypeekspression og mutantudvælgelse samt bedømmelsesprocedurernes egnethed. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte stoffer, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

47. Laboratoriet bør fastlægge:

— et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling

— et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.

48. Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte negative kontroldata. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (64)(65).

49. Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men fortrinsvis bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (65)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (66). Yderligere oplysninger og anbefalinger om, hvordan de historiske data kan opbygges og bruges, kan findes i litteraturen (64).

50. Negative kontroldata bør bestå af mutantfrekvenser fra enkeltkulturer eller fortrinsvis fra replikate kulturer som beskrevet i punkt 27. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 49), og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

▼M8

51. Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om dataene stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldatabaser. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

52. Præsentation af data for både MLA og TK6 bør for både behandlede kulturer og kontrolkulturer omfatte de nødvendige data til beregning af cytotoksisk effekt (henholdsvis RTG og RS) og mutantfrekevenser, som beskrevet nedenfor.

53. For MLA bør der anføres data for hver enkelt kultur for RSG, RTG, kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelsen og antallet af mutantkolonier (for agarversionen) eller antal tomme brønde (for mikrobrøndversionen). MF opgives som antallet af mutantceller pr. én million overlevende celler. Hvis reaktionen er positiv, bør MF'er i små og store kolonier (og eller procentdelen af den samlede MF) angives for mindst én koncentration af testkemikaliet (normalt den højeste positive koncentration) og de negative og positive kontroller. I tilfælde af en negativ reaktion bør MF'er i små og store kolonier angives for den negative og den positive kontrol.

54. For TK6 anføres data for hver enkelt kultur for RS, kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelse og antallet af tomme brønde for tidligt fremkomne og sent fremkomne mutanter. MF udtrykkes som antal mutantceller pr. antal overlevende celler og bør omfatte den samlede MF samt MF (og/eller procentdel af den samlede MF) af de tidligt og sent fremkomne mutanter.

Acceptkriterier

55. For både MLA og TK6 bør følgende kriterier opfyldes, før de samlede resultater for et specifikt testkemikalie bestemmes:

— To forsøgsbetingelser (kort behandling med og uden metabolisk aktivering – jf. punkt 33) blev gennemført, medmindre en af dem gav positive resultater.

— Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (jf. punkt 27, 34-36).

— Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 28-30.

Acceptkriterier for negative og positive kontroller

56. Expert MLA Workgroup's analyse af en omfattende mængde MLA-data førte til international enighed om specifikke acceptkriterier for MLA (1)(2)(3)(4)(5). Derfor giver denne forsøgsmetode specifikke anbefalinger om bestemmelse af, om negative og positive kontroller kan accepteres, og om vurdering af resultater for individuelle stoffer i MLA. TK6 har en langt mindre database og er ikke blevet vurderet af en arbejdsgruppe.

▼M8

57. For MLA bør hvert forsøg vurderes med hensyn til, om den ubehandlede kontrolkultur/kontrolkultur med opløsningsmiddel opfylder IWGT MLA Workgroup's acceptkriterier ((4) og tabel 2, nedenfor) for: (1) MF (bemærk, at IWGT's acceptable MF'er er forskellige for agar- og mikrobrøndversionerne af MLA), (2) kloningseffektivitet (CE) på tidspunktet for mutantudvælgelse og (3) suspensionsvækst (SG) for kontrolkulturen med opløsningsmiddel (jf. formlen i tillæg 2).

Tabel 2

Acceptkriterier for MLA

Parameter	Metode med blød agar	Mikrobrøndmetode
Mutantfrekvens	35-140 × 10^{-6}	50-170 × 10^{-6}
Kloningseffektivitet	65-120 %	65-120 %
Suspensionsvækst:	8-32 fold (3-4 timers behandling) 32-180 fold (24 timers behandling, hvis den gennemføres)	8-32 fold (3-4 timers behandling) 32-180 fold (24 timers behandling, hvis den gennemføres)

58. Ved MLA bør hver test også vurderes med hensyn til, om de positive kontroller opfylder mindst ét af følgende to acceptkriterier, der er udviklet af IWGT-arbejdsgruppen:

— Den positive kontrol bør påvise en absolut stigning i den samlede MF, dvs. en stigning over den spontane baggrunds-MF (en induceret MF (IMF)) på mindst 300 × 10^{-6}. Mindst 40 % af IMF bør afspejles i MF for den lille koloni.

— Den positive kontrol har en stigning i den lille MF-koloni på mindst 150 × 10^{-6} over det, der observeres i den samtidige ubehandlede kontrolkultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel (en lille IMF-kultur på 150 × 10^{-6}).

59. Ved TK6 vil en test kunne godtages, hvis den samtidige negative kontrol betragtes som acceptabel som supplement til laboratoriets historiske negative kontroldatabase som beskrevet i punkt 48-49. Endvidere bør de sideløbende positive kontroller (jf. punkt 32) fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontroldatabase, og medføre en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

60. For begge test bør den øvre cytotoksicitetsgrænse, som er observeret i den positive kontrolkultur, være den samme som for forsøgskulturerne. Dvs. at RTG/RS ikke bør ligge under 10 %. Det er tilstrækkeligt at anvende en enkelt koncentration (eller en af koncentrationerne fra de positive kontrolkulturer, hvis der anvendes mere end én koncentration) til at påvise, at acceptkriterierne for den positive kontrol er blevet opfyldt. Yderligere skal MF for den positive kontrol ligge inden for det acceptable område, der er fastsat for laboratoriet.

Vurdering og fortolkning af resultater

61. For MLA er der udført et betydeligt arbejde om biologisk relevans og kriterier for en positiv respons af Mouse Lymphoma Expert Workgroup under IWGT (4). Derfor giver denne forsøgsmetode specifikke anbefalinger til fortolkning af testkemikalieresultaterne fra MLA (jf. punkt 62-64). TK6

▼**M8**

har en langt mindre database og er ikke blevet vurderet af en arbejdsgruppe. Derfor formuleres anbefalingerne til fortolkning af data for TK6 i mere generelle vendinger (jf. punkt 65-66). Supplerende anbefalinger gælder for begge test (jf. punkt 67-71).

MLA

62. En metode til at definere positive og negative responser anbefales for at sikre, at den øgede MF er biologisk relevant. I stedet for statistisk analyse, som normalt benyttes til andre test, bygger den på anvendelse af forud induceret mutantfrekvens (dvs. øget MF over sideløbende kontrol), der betegnes den samlede vurderingsfaktor (GEF), som er baseret på analyse af data om fordelingen af den negative kontrol-MF fra deltagende laboratorier (4). For agarversionen af MLA er GEF 90 × 10^{-6}, og for mikrobrøndversionen af MLA er GEF 126 × 10^{-6}.

63. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis stigningen i MF over den sideløbende baggrund under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33) overstiger GEF, og stigningen er koncentrationsafhængig (f.eks. under anvendelse af en trendtest). Testkemikaliet anses herefter for at kunne fremkalde mutation i dette testsystem.

64. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis der under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33) ikke er nogen koncentrationsafhængig respons, eller, hvis der er en stigning i MF, den ikke overstiger GEF. Testkemikaliet anses herefter for ikke at kunne fremkalde mutationer i dette testsystem.

TK6

65. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33):

— mindst én af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— stigningen er koncentrationsafhængig, når den evalueres med en egnet trendtest (jf. punkt 33)

— et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %, jf. punkt 48).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliet for at kunne fremkalde mutation i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (66)(67).

66. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 33):

— ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol

— der ikke indtræder en koncentrationsafhængig stigning ved evaluering med en egnet trendtest

▼**M8**

— alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. den Poisson-baserede kontrolgrænse på 95 %). jf. punkt 48).

Testkemikaliet anses herefter for ikke at kunne fremkalde mutationer i dette testsystem.

For både MLA og TK6:

67. Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoksisk effekt, bør den højeste koncentration sigte mod at nå mellem 20 og 10 % RTG/RS. Der er enighed om, at der bør udvises omhu ved fortolkning af positive resultater, hvor der kun er fundet mellem 20 og 10 % RTG/RS, og et resultat vil ikke blive anset for at være positivt, såfremt stigningen i MF først opstod ved eller under 10 % RTG/RS (hvis det vurderes) (2)(59).

68. Der er nogle omstændigheder, hvor supplerende oplysninger kan være en hjælp til bestemmelsen af, at et testkemikalie ikke er et mutagent stof, når der ikke er nogen kultur, som viser en RTG-værdi mellem 10 og 20 % RTG/RS. Disse situationer er beskrevet i det følgende: (1) Der er ingen evidens for mutagenicitet (f.eks. ingen dosisrespons, ingen muantfrekevenser over dem, der ses i den sideløbende negative kontrol eller historiske baggrundsområder osv.) i en række datapunkter inden for 100 % til 20 % RTG/RS, og der er mindst ét datapunkt mellem 20 og 25 % RTG/RS. (2) Der er ingen mutagenicitet (f.eks. ingen dosisrespons, ingen mutantfrekevenser over dem, der ses i den sideløbende negative kontrol eller historiske baggrundsområder osv.) i en række datapunkter mellem 100 % til 25 % RTG/RS, og der er også et negativt datapunkt lidt over 10 % RTG/RS. I begge disse situationer kan det konkluderes, at testkemikaliet er negativt.

69. Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

70. Hvis responsen hverken er klart negativ eller klart positiv som beskrevet ovenfor og/eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene vurderes af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Det kan være nyttigt at gennemføre et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval for at øge sandsynligheden for at nå datapunkter inden for 10-20 % RTG/RS-området, ved hjælp af andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) og behandlingens varighed).

71. I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative. Konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er usikker (fortolkes på den måde, at der er lige stor sandsynlighed for, at den er positiv eller negativ).

TESTRAPPORT

72. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— oprindelse, batchnummer, sidste anvendelsesdato, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

▼**M8**

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

For laboratoriets stamkulturer:

— celletype og oprindelse samt historie i testlaboratoriet

— karyotypiske karakteristika og/eller normalt kromosomtal

— metoder til opretholdelse af cellekulturer

— fravær af mykoplasma

— cellernes fordoblingstid.

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal cellekulturer, herunder f.eks. data om cytotoksisk effekt og opløselighedsbegrænsninger

— mediesammensætning, CO_2-koncentration, fugtighedsniveau

— testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)

— koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet

— inkubationstemperatur

— inkubationstid

— behandlingens varighed

— celletæthed under behandlingen

▼**M8**

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde til S9, metode til fremstilling af den postmitochondriske fraktionsblanding (S9), koncentration eller rumfang af S9-blandingen og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)

— positive og negative kontrolstoffer, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse

— ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)

— det selektive stofs identitet og koncentration

— for MLA anføres den anvendte version (agar eller mikrobrønd)

— kriterier for accept af testene

— metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller

— metoder til måling af cytotoksisk effekt

— eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoksisk effekt og anvendt metode

— inkubationstidens varighed efter udpladning

— definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er "små" og "store")

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker

— anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet, hvis den udføres, og bundfald, hvis det er relevant.

Resultater:

— antal behandlede celler og antal celler dyrket i subkultur for hver kultur

— toksicitetsparametre (RTG for MLA og RS for TK6)

— tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse

— antal celler udpladet i selektivt og ikke-selektivt dyrkningsmedium

— antal kolonier i det ikke-selektive dyrkningsmedium og antal resistente kolonier i det selektive medium samt den tilhørende mutantfrekvens

— bestemmelse af størrelse for de negative og positive kontroller, og hvis testkemikaliet er positivt, mindst én koncentration og deraf afhængig mutantfrekevens

— koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt

— sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontroller (koncentrationer og opløsningsmidler)

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel) og positive kontroller (koncentrationer og opløsningsmidler) med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser antal test, der danner grundlag for de historiske kontroller

▼M8

— statistiske analyser (for de enkelte kulturer og eventuelt for samlede replikater) og eventuelle P-værdier og for MLA, GEF-vurderingen.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. og Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. og Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. og Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. og Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. og Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

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

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. og O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. og Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. og Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., og Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. og Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. og Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. og Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. og Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. og Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. og Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. og Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. og Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. og Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan og M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. og Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. og Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. og Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. og Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. og Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. og Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. og Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. og Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. og Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. og Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. og DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. og Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. og Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. og Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuskript under udarbejdelse).

(38) Lloyd M. og Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. og Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z og Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. og Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. og Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. og Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. og Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. og Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. og De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. og Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. og Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. og Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. og Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

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

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. og Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. og Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, s. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. og Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. og Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Tilgængelig på: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. og Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. og Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. og Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. og Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. og Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

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

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. og Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneugen: alle kemikalier eller processer, der ved interaktion med komponenterne i den mitotiske og meiotiske celledelingscyklus forårsager aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Basesubstitutionsmutagener: kemikalier, der forårsager substitution af basepar i DNA.

Kemikalie: et stof eller en blanding

Kloningseffektivitet: procentdel af celler, som udplades med lav tæthed og kan vokse til en koloni, der kan tælles.

Klastogen: alle kemikalier eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Cytotoksisk effekt: for de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, identificeres cytotoksisk effekt som en reduktion i relativ total vækst (RTG) eller relativ overlevelse (RS) for henholdsvis MLA og TK6.

Fremadmutation: en genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet eller funktion.

Frameshift-mutagener: kemikalier, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Genotoksisk: et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder DNA-brud, addukter, omlejringer, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitotisk rekombination: under mitosen, rekombination mellem homologe kromatider, der muligvis medfører induktion af brud på DNA-dobbeltstrenge eller tab af heterozygoti.

Mutagen: forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Mutantfrekvens (MF): antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

Fænotypeekspressionsperiode: det tidsrum efter behandling, hvor den genetiske ændring repareres i genomet, og alle eksisterende genprodukter forsvinder, således at det fænotypiske karakteristikum ændres.

Relativ overlevelse (RS): RS bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoksisk effekt i TK6. Det er cellernes relative kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter cellebehandlingen, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenholdt med kloningseffektiviteten i den negative kontrol.

▼M8

Relativ suspensionsvækst (RSG): For MLA: testkulturens relative totale to dage lange suspensionsvækst sammenlignet med den samlede to dage lange suspensionsvækst for den negative kontrolkultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel (Clive og Spector, 1975). RSG bør omfatte testkulturens relative vækst sammenlignet med den negative kontrolkultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel i behandlingsperioden.

Relativ total vækst (RTG): RTG bruges til at måle behandlingsrelateret cytotoksisk effekt i MLA. Den er et mål for testkulturernes relative (i forhold til bærestofkontrollen) vækst under behandlingen, den to dage lange ekspression og udvælgelsen af mutanter til kloning i testforløbet. RSG for hver testkultur ganges med testkulturens relative kloningseffektivitet på tidspunktet for mutantudvælgelsen og angivet i forhold til kloningseffektiviteten for den negative kontrolkultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel (Clive og Spector, 1975).

S9-leverfraktioner: supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: blanding med postmitochondrisk fraktion (S9) af lever og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Suspensionsvækst (SG): foldstigning i antallet af celler i løbet af behandlings- og ekspressionsfaserne af MLA. SG beregnes ved at gange foldstigningen på dag 1 med foldstigningen på dag 2 for den korte (3-4-timers) behandling. Benyttes en 24-timers behandling, er SG foldstigningen i løbet af 24-timers behandlingen ganget med foldstigningerne på ekspressionsdag 1 og 2.

Kontrolkultur med opløsningsmiddel: generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Ubehandlet kontrol: kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

▼M8

Tillæg 2

FORMLER

Cytotoksisk effekt

For begge versioner (agar og mikrobrønd) af MLA

Cytotoksisk effekt defineres som den relative totale vækst (RTG), der omfatter den relative suspensionsvækst (RSG) i den to dage lange suspensionsperiode og den relative kloningseffektivitet (RCE), der opnås på tidspunktet for udvælgelsen af mutanter. RTG, RSG og RCE angives alle som en procentdel.

Beregning af RSG: Suspensionsvækst 1 (SG_1) er vækstraten mellem dag 0 og dag 1 (cellekoncentration på dag 1/cellekoncentration på dag 0), og suspensionsvækst 2 (SG_2) er vækstraten mellem dag 1 og dag 2 (cellekoncentration på dag 2/cellekoncentration på dag 1). RSG er den samlede SG ($SG_1 \times SG_2$) for den behandlede kultur sammenlignet med den ubehandlede kultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel. Det vil sige, at RSG = $(SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(kontrol)} \times SG_{2(kontrol)})$. SG_1 beregnes ud fra den initiale cellekoncentration, som blev anvendt ved påbegyndelsen af cellebehandlingen. Dette gælder for en eventuel differentierende cytotoksisk effekt, der opstår i testkulturen/testkulturerne under cellebehandlingen.

RCE er testkulturens relative kloningseffektivitet sammenlignet med den relative kloningseffektivitet for den ubehandlede kultur/kontrolkulturen med opløsningsmiddel, der opnås på tidspunktet for udvælgelsen af mutanter.

Relativ total vækst (RTG): RTG = RSG × RCE

TK6

Relativ overlevelse (RS):

Cytotoksisk effekt vurderes ved anvendelse af den relative overlevelse, dvs. cellernes kloningseffektivitet (CE), når de udplades umiddelbart efter behandling, justeret for ethvert celletab under behandlingen sammenholdt med kloningseffektiviteten i de negative kontroller (tildeles en overlevelsesprocent på 100 %). Justeringen for celletab under behandling kan beregnes som følger:

$$\text{Justeret CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Antal celler ved behandlingsforløbets afslutning}}{\textit{Antal celler ved behandlingsforløbets begyndelse}}$$

RS for en kultur, der er behandlet med et testkemikalie, beregnes som:

$$RS = \frac{\textit{Justeret CE i den behandlede kultur}}{\textit{Justeret CE i kontrolkulturen med opløsningsmiddel}} \times 100$$

Mutantfrekvens for både MLA og TK6

Mutantfrekvens (MF) er mutantkoloniers kloningsseffektivitet i selektivt dyrkningsmedium (CE_M) justeret for kloningsseffektiviteten i ikke-selektivt medium på mutantudvælgelsestidspunktet (CE_V). Dvs. $MF=CE_M/CE_V$. Beregningen af disse to former for klondannelseseffektivitet er beskrevet nedenfor for kloningsmetoder for agar og mikrobrønd.

▼**M8**

***MLA-agarversion*:** I den version af MLA, der anvender blød agar, fås antallet af kolonier på mutantselektionspladen (C_M) og antallet af kolonier på pladen uden selektion eller kloningseffektivitet (levedygtig tælling) (C_V) ved direkte at tælle klonerne. Når der er udpladet 600 celler med henblik på kloningseffektivitet (CE) til plader med mutantudvælgelse (CE_M) og plader uden udvælgelse eller kloningseffektivitet (levedygtig tælling) (CE_V), og der anvendes 3×10^6-celler til udvælgelse af mutanter, er

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

MLA- og TK6-mikrobrøndversion: I mikrobrøndversionen af MLA bestemmes C_M og C_V som produktet af det samlede antal mikrobrønde (TW) og det sandsynlige antal kolonier pr. brønd (P) på plader med mikrobrønde.

$C_M = P_M \times TW_M$

$CV = P_V \times TW_V$

Ud fra nul-betingelsen i Poisson-fordelingen (Furth et al., 1981), angives P ved

$P = - \ln (EW / TW)$

hvor EW er tomme brønde, og TW er totale brønde. Derfor gælder følgende:

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

For mikrobrøndversionen af MLA beregnes mutantfrekevenser for små og store kolonier på samme måde ved anvendelse af det relevante antal tomme brønde for små og store kolonier.

For TK6 er mutantfrekvenser for små og store kolonier baseret på tidligt og sent fremkomne mutanter.

▼M8

B.68. **FORSØGSMETODE MED KORTVARIG EKSPONERING IN VITRO TIL IDENTIFIKATION AF i) KEMIKALIER, DER FREMKALDER ALVORLIGE ØJENSKADER, OG ii) KEMIKALIER, DER IKKE KRÆVER KLASSIFICERING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 491 (2017). Forsøgsmetoden med kortvarig eksponering (STE) er en in vitro-metode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger til fareklassificering og mærkning af kemikalier (stoffer og blandinger), der fremkalder alvorlige øjenskader samt kemikalier, der ikke kræver klassificering hverken for alvorlige øjenskader eller for øjenirritation som defineret i De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (kategori 1) og Den Europæiske Unions (EU) forordning nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]).

2. I mange år er kemikaliers potentielle risiko for øjenskade primært blevet vurderet ved anvendelse af en in vivo-kaninøjentest (TM B.5 (8), som svarer til OECD TG 405). Det er generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt alternativ in vitro-test, der fuldt ud vil kunne erstatte in vivo-kaninøjentesten til forudsigelse af hele spektret af alvorlige øjenskade-/øjenirritationsreaktioner for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis fuldt ud erstatte kaninøjentesten (2). Top-down-tilgangen er beregnet til testning af kemikalier, som baseret på eksisterende information kan forventes at have et højt irritationspotentiale eller fremkalde alvorlige øjenskader. Omvendt er bottom-up-tilgangen beregnet til testning af kemikalier, der baseret på eksisterende information ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til, at der kræves en klassificering. Selv om STE-forsøgsmetoden ikke betragtes som værende en fuldstændig erstatning for in vivo-kaninøjentesten, er den egnet til brug som del af en trindelt teststrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning såsom top-down/bottom-up-tilgangen til uden yderligere testning at identificere (i) kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1), og (ii) kemikalier (bortset fra meget flygtige stoffer og alle andre faste kemikalier end overfladeaktive stoffer), som ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori) (1)(2). Et kemikalie, der hverken forventes at forårsage alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1) eller UN GHS/CLP – uden for kategori (hverken fremkalder alvorlige øjenskader eller øjenirritation) ved STE-forsøgsmetoden, vil dog skulle testes yderligere for at fastslå en endelig klassificering. Desuden bør de relevante kompetente myndigheder høres, før STE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS/CLP. Valget af den mest egnede forsøgsmetode og anvendelsen af denne forsøgsmetode bør ses i forbindelse med OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for alvorlige øjenskader og øjenirritation (14).

3. Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskader baseret på dets evne til at fremkalde en cytotoksisk effekt ved

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M8

forsøgsmetoden med kortvarig eksponering. Kemikaliers cytotoksiske effekt på cornea-epithelceller er en vigtig virkemåde, der fører til cornea-epithelskade og øjenirritation. Cellernes levedygtighed ved STE-forsøgsmetoden vurderes ved kvantitativ måling efter ekstraktion fra celler af blåt formazansalt produceret af de levende celler ved enzymomdannelse af vitalfarvestoffet MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), også kaldet thiazolylblåt tetrazolium-bromid (3). Den opnåede cellelevedygtighed sammenholdes med kontrolkulturen med opløsningsmiddel (relativ levedygtighed) og bruges til at anslå testkemikaliets potentielle risiko for øjet. Et testkemikalie klassificeres som UN GHS/CLP-kategori 1, når både 5 %- og 0,05 %-koncentrationerne medfører en cellelevedygtighed under eller lig med (≤) 70 %. Omvendt forudses et kemikalie at kunne klassificeres som UN GHS/CLP – uden for kategori 1, når både 5 %- og 0,05 %-koncentrationerne medfører en cellelevedygtighed over (>) 70 %.

4. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af STE-forsøgsmetoden til testning af stoffer og/eller blandinger. Definitioner findes i tillægget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

5. Denne forsøgsmetode er baseret på en protokol udviklet af Kao Corporation (4), som var genstand for to forskellige valideringsundersøgelser: en, der blev foretaget af valideringsudvalget under det japanske selskab for alternativertil dyreforsøg (Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE)) (5), og et andet, der blev foretaget af det japanske center for validering af alternative metoder (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)) (6). Der blev foretaget et peer review af NICEATM/ICCVAM på grundlag af valideringsundersøgelsesrapporter og background review-dokumenter om forsøgsmetoden (7).

6. Når data opnået med STE-forsøgsmetoden på 125 kemikalier (bl.a. både stoffer og blandinger) blev anvendt til at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1) (1), udviste de en generel nøjagtighed på 83 % (104/125), en falsk positiv-rate på 1 % (1/86) og en falsk negativ-rate på 51 % (20/39) sammenlignet med in vivo-kaninøjentesten (7). Falsk negativ-raten er ikke kritisk i den aktuelle sammenhæng, eftersom alle testkemikalier, der medfører en cellelevedygtighed på ≤ 70 % ved en 5 % koncentration og > 70 % ved en 0,05 % koncentration efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-forsøgsmetoder eller, som en sidste mulighed, i in vivo-kaninøjentesten alt efter de forskriftsmæssige krav og i overensstemmelse med en sekventiel testningsstrategi med den "weight of evidence"-analyse, som i øjeblikket anbefales (1) (8). Der blev hovedsagelig testet stoffer med kun én bestanddel, skønt der også findes en begrænset mængde data om test af blandinger. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og i forskellige blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. STE-forsøgsmetoden viste ingen andre særlige mangler, da den blev benyttet til at identificere testkemikalier som UN GHS/CLP-kategori 1. Undersøgeren kan overveje at anvende denne forsøgsmetode på testkemikalier, hvorved en cellelevedygtighed på ≤ 70 ved både 5 % og 0,05 % koncentration bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, der bør klassificeres som UN GHS/CLP-kategori 1 uden yderligere test.

▼**M8**

7. Når data opnået med STE-forsøgsmetoden på 130 kemikalier (bl.a. både stoffer og blandinger) anvendes til at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), som ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlige øjenskader (dvs. UN GHS/CLP – uden for kategori), udviste de en generel nøjagtighed på 85 % (110/130), en falsk negativ-rate på 12 % (9/73) og en falsk positiv-rate på 19 % (11/57) sammenlignet med in vivo-kaninøjentesten (7). Hvis meget letflygtige stoffer og andre faste stoffer end overfladeaktive stoffer udelukkes fra datasættet, forbedres den generelle nøjagtighed til 90 % (92/102), falsk negativ-raten til 2 % (1/54) og falsk positiv-raten til 19 % (9/48) (7). Som følge heraf er de potentielle mangler ved STE-forsøgsmetoden, når den benyttes til at identificere testkemikalier, som ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori), en høj falsk negativ-rate for i) meget flygtige stoffer med et damptryk over 6 kPa og ii) andre faste kemikalier (stoffer og blandinger) end overfladeaktive stoffer og blandinger, som udelukkende består af overfladeaktive stoffer. Sådanne kemikalier er udelukket fra STE-forsøgsmetodens anvendelsesområde (7).

8. Bortset fra de kemikalier, der er nævnt i punkt 6 og 7, indeholder det datasæt, som blev genereret af STE-forsøgsmetoden, også interne data om 40 blandinger, som sammenholdt med in vivo-Draize-øjentesten udviste en nøjagtighed på 88 % (35/40), en falsk positiv-rate på 50 % (5/10) og en falsk negativ-rate på 0 % (0/30) for forudsigelse af blandinger, der ikke kræver klassificering i henhold til UN GHS/CLP-klassificeringssystemer (9). STE-forsøgsmetoden kan derfor benyttes til at identificere blandinger som UN GHS/CLP – uden for kategori ved en bottom-up-tilgang med undtagelse af andre faste blandinger end dem, der udelukkende består af overfladeaktive stoffer som en udvidelse af dens begrænsning til faste stoffer. Endvidere bør blandinger, der indeholder stoffer med et højere damptryk end 6kPa, vurderes omhyggeligt for at undgå undervurdering i de potentielle forudsigelser og bør begrundes i hvert enkelt tilfælde.

9. STE-forsøgsmetoden kan ikke benyttes til identifikation af testkemikalier som UN GHS/CLP-kategori 2 eller UN GHS-kategori 2A (øjenirritation) eller 2B (mild øjenirritation) på grund af det betydelige antal kemikalier i UN GHS/CLP-kategori 1, der er undervurderet som kategori 2, 2A eller 2B og kemikalier i UN GHS/CLP – uden for kategori, der er overvurderet som kategori 2, 2A eller 2B (7). Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere testning med en anden egnet metode.

10. STE-forsøgsmetoden er egnet til testkemikalier, der er opløst eller har været ensartet suspenderet i mindst fem minutter i fysiologisk saltopløsning, 5 % dimethylsulfoxid (DMSO) i fysiologisk saltopløsning eller mineralolie. STE-forsøgsmetoden er ikke egnet til testkemikalier, der er uopløselige eller ikke kan suspenderes ensartet i mindst fem minutter i fysiologisk saltopløsning, 5 % DMSO i fysiologisk saltopløsning eller mineralolie. Anvendelsen af mineralolie i STE-forsøgsmetoden er mulig på grund af den kortvarige eksponering. Derfor er STE-forsøgsmetoden egnet til at forudsige vanduopløselige testkemikaliers (dvs. *f.eks.* langkædede fedtalkoholer eller ketonstoffer) potentielle risiko for at forårsage øjenskader, forudsat at de kan blandes i mindst ét af de tre ovennævnte opløsningsmidler (4).

▼M8

11. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes ([1]), og vedrører ikke STE-forsøgsmetodens anvendelighed til testning af stoffer og/eller blandinger.

PRINCIP FOR TESTEN

12. STE-forsøgsmetoden er et cytotoksicitetsbaseret in vitro-assay, som udføres på et sammenflydende enkeltlag af cornea-celler fra kanin fra Statens Seruminstitut (SIRC) dyrket på en polycarbonat-mikroplade med 96 brønde (4). Efter fem minutters eksponering for testkemikaliet måles den cytotoksiske effekt kvantitativt som den relative levedygtighed af SIRC-celler ved anvendelse af MTT-assayet (4). Nedsat cellelevedygtighed anvendes til at forudsige potentielle skadelige virkninger, som medfører øjenskade.

13. Det er rapporteret, at 80 % af en opløsning dryppet i et kaninøje udskilles gennem saccus conjunctivalis inden for 3-4 minutter, mens en højere opløsning end 80 % dryppet i det menneskelige øje udskilles inden for 1-2 minutter (10). Ved STE-forsøgsmetoden forsøges det at tilnærme disse eksponeringstider ved anvendelse af cytotoksisk effekt som en effektparameter for at vurdere omfanget af skade på SIRC-celler efter en fem minutter lang eksponering for testkemikaliet.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

14. Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af STE-metoden, som beskrives i denne forsøgsmetode, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af de 11 anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer blev udvalgt til at repræsentere det fuldstændige responsområde for alvorlige øjenskader eller øjenirritation på grundlag af resultaterne af in vivo-kaninøjentest (TG 405) og UN GHS/CLP-klassificeringssystemet (1). Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne skulle være kommercielt tilgængelige, at in vivo-referencedata af høj kvalitet skulle kunne fås i handelen, og at in vitro-data af høj kvalitet fra STE-forsøgsmetoden skulle være tilgængelige (3). I situationer, hvor et stof på listen ikke kan fås, eller hvor det er begrundet, kan et andet stof anvendes, hvis der foreligger tilstrækkelige in vivo- og in vitro-referencedata herfor, forudsat at der benyttes de samme kriterier som beskrevet her.

Tabel 1

Listen over kompetencestoffer

Stof	CAS RN	Kemikaliegruppe ([1])	Fysisk form	In vivo UN GHS/CLP-kategori ([2])	Opløsningsmiddel i STE-test	STE UN GHS/CLP-kat.
Benzalkoniumchlorid (10 %, vandig)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Flydende	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1

([1]) I juni 2013 blev det fælles møde enig om, at betegnelsen "testkemikalie", hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede forsøgsmetoder til at beskrive, hvad det er der testes.

▼**M8**

Stof	CAS RN	Kemikaliegruppe ([1])	Fysisk form	In vivo UN GHS/CLP-kategori ([2])	Opløsningsmiddel i STE-test	STE UN GHS/CLP-kat.
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyklisk forbindelse, bromforbindelse, chlorforbindelse	Fast	Kategori 1	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Alkali, uorganisk kemikalie	Fast	Kategori 1 ([3])	Fysiologisk saltopløsning	Kategori 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton, heterocyklisk forbindelse	Flydende	Kategori 2A (kategori 2 i CLP)	Fysiologisk saltopløsning	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
1-octanol	111-87-5	Alkohol	Flydende	Kategori 2A/B ([4]) (kategori 2 i CLP)	Mineralolie	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
Cyclopentanol	96-41-3	Alkohol, kulbrinte, cyklisk	Flydende	Kategori 2A/B ([5]) (kategori 2 i CLP)	Fysiologisk saltopløsning	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
2-ethoxyethylacetat	111-15-9	Alkohol, Ether	Flydende	Uden for kategori	Fysiologisk saltopløsning	Uden for kategori
Dodecan	112-40-3	Kulbrinte, cyklisk	Flydende	Uden for kategori	Mineralolie	Uden for kategori
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Flydende	Uden for kategori	Mineralolie	Uden for kategori

▼M8

Stof	CAS RN	Kemikaliegruppe ([1])	Fysisk form	In vivo UN GHS/CLP-kategori ([2])	Opløsningsmiddel i STE-test	STE UN GHS/CLP-kat.
1,1-dimethylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, svovlforbindelse	Fast	Uden for kategori	Fysiologisk saltopløsning	Uden for kategori

([1]) De kemiske stofgrupper blev fastsat ud fra oplysninger fra tidligere NICEATM-publikationer, og hvis de ikke var tilgængelige, fra National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® (National Library of Medicine), som findes på http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), og opbygning fastlagt af NICEATM.

([2]) Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) og ved anvendelse af UN GHS/CLP (1).

([3]) Klassificering som kategori 1 er baseret på den hudætsende evne af 100 % natriumhydroxid (opført på listen som et hudætsende kompetencekemikalie i OECD TG 435) og kriteriet for UN GHS/CLP-kategori 1 (1).

([4]) Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for sondring mellem disse to kategorier, dvs. 2 dyr ud af 6 mod 4 dyr ud af 6 med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-datasættet omfattede to undersøgelser med tre dyr i hver. I en undersøgelse udviste to ud af tre dyr virkninger på dag 7, hvilket begrunder en kategori 2A-klassificering (11), mens alle effektparametre i den anden undersøgelse hos alle tre dyr udviste en bedring til en score på nul inden dag 7, hvilket begrunder en kategori 2B-klassificering (12).

([5]) Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for sondring mellem disse to kategorier, dvs. 1 dyr ud af 3 mod 2 dyr ud af 3 med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle effektparametre bortset fra cornea-uklarhed og conjunctiva-rødme hos ét dyr opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Det ene dyr, som ikke var kommet sig fuldstændig på dag 7, havde en score for cornea-uklarhed på 1 og en conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7) med fuld bedring på dag 14 (11).

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

FREMGANGSMÅDE

Præparering af cellemonolaget

15. Cornea-cellelinjen fra kanin, SIRC, bør anvendes til at udføre STE-forsøgsmetoden. Det anbefales, at SIRC-celler anskaffes fra en velkvalificeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection CCL60.

16. SIRC-celler dyrkes ved 37 °C under 5 % CO_2 og fugtig atmosfære i en dyrkningsbeholder med et dyrkningsmedium bestående af Eagle's minimum essential medium (MEM) suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 50-100 enheder/ml penicillin og 50-100 µg/ml streptomycin. Celler, der er flydt sammen i dyrkningsflasken, bør adskilles ved hjælp af en opløsning af trypsin-ethylendiamintetraeddikesyre med eller uden brug af en celleskraber. Celler opformeres (f.eks. 2-3 generationer) i en dyrkningsflaske, før de anvendes til rutinetest og bør højst dyrkes i 25 generationer fra optøning.

17. Celler, der er klar til brug i STE-forsøget, præpareres herefter ved passende tæthed og udsås på plader med 96 brønde. Den anbefalede celleudsåningstæthed er $6{,}0 \times 10^3$ celler pr. brønd, når cellerne anvendes fire dage efter udsåning, eller $3{,}0 \times 10^3$ celler pr. brønd, når cellerne anvendes fem dage efter udsåning ved en dyrkningsvolumen på 200 µl. Celler, der anvendes til STE-forsøget og udsås i et dyrkningsmedium med en passende tæthed, vil nå en konfluens på over 80 % på forsøgstidspunktet, *dvs.* 4-5 dage efter udsåningen.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

18. Førstevalget af opløsningsmiddel til opløsning eller suspension af testkemikalier er fysiologisk saltopløsning. Hvis testkemikaliet udviser lav opløselighed eller ikke kan opløses eller suspenderes ensartet i mindst fem minutter

▼M8

i fysiologisk saltopløsning, anvendes 5 % DMSO (CAS#67-68-5) i fysiologisk saltopløsning som et sekundært valg af opløsningsmiddel. Til testkemikalier, der ikke kan opløses eller suspenderes ensartet i mindst fem minutter i enten en fysiologisk saltopløsning eller 5 % DMSO i fysiologisk saltopløsning, anvendes mineralolie (CAS#8042-47-5) som et tredjevalg af opløsningsmiddel.

19. Testkemikalier opløses eller suspenderes ensartet i det valgte opløsningsmiddel ved en koncentration på 5 % (w/w) og yderligere fortyndet med en 10-fold seriefortynding til 0,5 % og 0,05 % koncentration. Hvert testkemikalie skal testes ved koncentrationer på både 5 % og 0,05 %. Celler dyrket på en plade med 96 brønde eksponeres for 200 µl/brønd med enten en 5 %- eller en 0,05 %-koncentration af testkemikalieopløsningen (eller -suspensionen) i fem minutter ved stuetemperatur. Testkemikalier (stoffer med kun én bestanddel eller stoffer med flere bestanddele eller blandinger) anses for at være ublandede stoffer og fortyndes eller suspenderes i overensstemmelse med metoden uanset deres renhed.

20. Dyrkningsmediet, som er beskrevet i punkt 16, anvendes som mediekontrol på hver plade for hver repetition. Cellerne skal desuden eksponeres for prøver af kontrolkultur med opløsningsmiddel på hver plade for hver repetition. De opløsningsmidler, der er anført i punkt 18, har ingen negative virkninger på SIRC-cellers levedygtighed.

21. Ved STE-forsøgsmetoden skal 0,01 % natriumlaurylsulfat (SLS) i fysiologisk saltopløsning anvendes som positiv kontrol på hver plade for hver repetition. For at beregne cellernes levedygtighed i den positive kontrol skal hver plade for hver repetition også omfatte en kontrol med fysiologisk saltopløsning.

22. En blindprøve er nødvendig for at bestemme kompensationen for optisk tæthed og bør udføres på brønde, som kun indeholder phosphatbufret fysiologisk saltopløsning, men ingen calcium og magnesium (PBS-) eller celler.

23. Hver prøve (testkemikalie ved 5 % og 0,05 %, mediekontrol, kontrolkultur med opløsningsmiddel og positiv kontrol) bør testes tre gange i hver repetition ved at eksponere cellerne for 200 µl af det rette test- eller kontrolkemikalie i fem minutter ved stuetemperatur.

24. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialet for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentiale for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponser.

Måling af cellelevedygtighed

25. Efter eksponering vaskes cellerne to gange med 200 µl PBS, og 200 µl MTT-opløsning (0,5 mg MTT/ml dyrkningsmedium) tilsættes. Efter en to timer lang reaktionstid i en inkubator (37 °C, 5 % CO_2) dekanteres MTT-opløsningen, MTT-formazan ekstraheres ved at tilsætte 200 µl 0,04 N hydrochloridsyre-isopropanol i 60 minutter i mørke ved stuetemperatur, og absorbansen af MTT-formazanopløsningen måles ved 570 nm med en pladelæser. Der opstår kun interferens mellem testkemikalier og MTT-assayet (med farvestoffer eller direkte MTT-opløsninger), hvis en betydelig mængde testkemikalie tilbageholdes i testsystemet som følge af rensning efter eksponering, hvilket er tilfældet med rekonstrueret human cornea i 3D eller rekonstrueret human epidermisvæv i 3D, men er ikke relevant for 2D-cellekulturer, som anvendes til STE-forsøgsmetoden.

▼M8

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

26. De værdier for optisk tæthed (OD), der er opnået for hvert testkemikalie, benyttes herefter til at beregne cellelevedygtighed i forhold til kontrolturen med opløsningsmiddel, der er fastsat til 100 %. Den relative cellelevedygtighed angives som en procentdel og opnås ved at dividere testkemikaliets OD med OD for kontrolkulturen med opløsningsmiddel efter fratrækning af blindprøvens OD fra begge værdier.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570}\ of\ test\ chemical) - (OD_{570}\ of\ blank)}{(OD_{570}\ solvent\ control) - (OD_{570}\ of\ blank)} \times 100$$

Tilsvarende angives den relative cellelevedygtighed for hver kontrolkultur med opløsningsmiddel som en procentdel og fås ved at dividere OD for hver kontrolkultur med opløsningsmiddel med OD for mediekontrollen efter fratrækning af blindprøvens OD fra begge værdier.

27. Der bør udføres tre uafhængige repetitioner, som hver indeholder tre replikatbrønde (*dvs.* n=9). Det aritmetiske gennemsnit af de tre brønde for hvert testkemikalie og hver kontrolkultur med opløsningsmiddel i hver uafhængig repetition bruges til at beregne det aritmetiske gennemsnit for relativ cellelevetid. Det endelige aritmetiske gennemsnit for cellelevedygtighed beregnes ud fra de tre uafhængige repetitioner.

28. Cut-off-værdierne for cellelevedygtighed til identificering af testkemikalier, som medfører alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1), og testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori) er angivet nedenfor.

Tabel 2

Forudsigelsesmodel for STE-forsøgsmetoden

Cellernes levedygtighed		UN GHS/CLP-klassificering	Anvendelse
Ved 5 %	Ved 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Uden for kategori	Stoffer og blandinger med undtagelse af: i) meget flygtige stoffer med et damptryk over 6 kPa ([1]) og ii) andre faste kemikalier (stoffer og blandinger) end overfladeaktive stoffer og blandinger, som kun består af overfladeaktive stoffer
≤ 70 %	> 70 %	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	Ikke relevant
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategori 1	Stoffer og blandinger ([2])

([1]) Blandinger, der indeholder stoffer med et højere damptryk end 6kPa, vurderes omhyggeligt for at undgå undervurdering i de potentielle forudsigelser og bør begrundes i hvert enkelt tilfælde.

([2]) På grundlag af resultater, der hovedsagelig var opnået med stoffer med kun én bestanddel, men der findes også en begrænset mængde data om test af blandinger. Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og i forskellige blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

▼M8

Acceptkriterier

29. Testresultaterne anses for at være acceptable, når alle de følgende kriterier er opfyldt:

a) Mediekontrollens optiske tæthed (eksponeret for dyrkningsmediet) bør være 0,3 eller højere efter fratrækning af blindprøvens optiske tæthed.

b) Levedygtigheden for kontrolkulturen med opløsningsmiddel bør være 80 % eller derover i forhold til mediekontrollen. Såfremt der anvendes mange kontrolkulturer med opløsningsmiddel i hver repetition, bør hver af disse kontroller vise en større cellelevedygtighed end 80 % for at kvalificere de testede testkemikalier med de pågældende opløsningsmidler.

c) Den cellelevedygtighed, der opnås med den positive kontrol (0,01 % SLS), bør ligge inden for standardafvigelserne for det historiske gennemsnit. De øvre og nedre acceptgrænser for den positive kontrol bør opdateres hyppigt, dvs. hver tredje måned eller hver gang, der udføres en acceptabel test i laboratorier, hvor der sjældent udføres test (dvs. sjældnere end én gang om måneden). Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust, positiv kontrolfordeling, kan det accepteres at benytte de øvre og nedre acceptgrænser, som fastsættes af metodeudvikleren, dvs. mellem 21,1 % og 62,3 %, i overensstemmelse med laboratoriets tidligere data, mens en intern fordeling opbygges under de første rutinetest.

d) Standardafvigelsen for den endelige cellelevedygtighed, som udledes af tre uafhængige repetitioner, bør ligge under 15 % for både 5 %- og 0,05 %-koncentrationer af testkemikaliet.

Hvis et eller flere af disse kriterier ikke opfyldes, bør der ses bort fra resultaterne, og tre andre uafhængige repetitioner udføres.

DATA OG RAPPORTERING

Data

30. Data rapporteres for hver enkelt brønd (f.eks. værdier for cellernes levedygtighed) for hver repetition og samlet gennemsnit, standardafvigelse og klassificering.

Testrapport

31. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie og kontrolstoffer

— Stof med kun én bestanddel: kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger: kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

— fysisk tilstand, flygtighed, pH, LogP, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt

▼**M8**

— renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Betingelser for forsøgsmetoden og procedurer

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— beskrivelse af den anvendte forsøgsmetode

— anvendte cellelinjer, deres oprindelse, antal generationer og graden af konfluens for de celler, der anvendes til test

— detaljer om den anvendte testprocedure

— antal anvendte gentagelser og replikater

— koncentrationer af testkemikaliet (hvis en anden end de anbefalede)

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier

— varigheden af eksponeringen for testkemikaliet (hvis en anden end den anbefalede)

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier

— henvisning til det tidligere positive kontrolgennemsnit og standardafvigelse:

— påvisning af laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Resultater

— for hvert testkemikalie og kontrolstof og hver testet koncentration bør de enkelte OD-værdier for hver replikatbrønd opstilles i tabelform, og følgende angives: det aritmetiske gennemsnit af OD-værdier for hver uafhængig repetition, den procentvise cellelevedygtighed for hver uafhængig repetition og det endelige aritmetiske gennemsnit for cellelevedygtighed og standardafvigelse i procent over tre repetitioner

— resultater for dyrkningsmedium, opløsningsmiddel og positiv kontrol, der påviser egnede acceptkriterier for undersøgelsen

— beskrivelse af andre observerede virkninger

— den samlede afledte klassificering med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller de anvendte beslutningskriterier.

▼M8

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York and Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Tilgængelig på: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS og Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1 648-1 653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruxelles, Belgien.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tillæg

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for konkordans, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden giver (13).

Referencestof: et stof, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder, (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes, (iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber, (iv) støttedata om kendte egenskaber og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Bottom-up-tilgang: en trinvis tilgang til et testkemikalie, som mistænkes for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader, og som starter med bestemmelse af kemikalier, der ikke kræver klassificering (negativt resultat) i forhold til andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Øjenirritation: frembringelse af forandring i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversibelt inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Reversible virkninger på øjet" og UN GHS/CLP-kategori 2.

Falsk negativ-rate: den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skadelige virkninger, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Mediekontrol: et ubehandlet replikat, som indeholder alle et testsystems komponenter. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Blanding: blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid thiazolylblåt tetrazolium-bromid.

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved at blande to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

▼M8

OD: optisk tæthed.

Positiv kontrol: et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (10).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (13).

Følsomhed: andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (10).

Alvorlig øjenskade: frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "irreversible virkninger på øjet" og UN GHS/CLP-kategori 1.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: en ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det opløsningsmiddel eller bærestof, som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontroller for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (13).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillet, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Overfladeaktivt stof: også kaldet for afspændingsmiddel. Dette kemikalie, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer, kaldes også for befugtningsmiddel.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

▼M8

Trindelt testningsstrategi: ved anvendelse af den trinvise teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en "weight of evidence"-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges på grundlag af eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges på grundlag af eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Top-down-tilgang: trinvis tilgang, som anvendes for et testkemikalie, der mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, og som starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

UN GHS/CLP-kategori 1: se "Alvorlige øjenskader".

UN GHS/CLP-kategori 2: se "Øjenirritation".

UN GHS/CLP – uden for kategori: Kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller UN GHS-kategori 2A 2Beller 2B).

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M8

B.69. **FORSØGSMETODE MED REKONSTRUERET HUMANT CORNEA-LIGNENDE EPITHEL (RhCE) TIL PÅVISNING AF KEMIKALIER, SOM IKKE KRÆVER KLASSIFICERING OG MÆRKNING FOR ØJENIRRITATION ELLER ALVORLIGE ØJENSKADER**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 492 (2017). *Alvorlige øjenskader* defineres som frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring som defineret i De Forenede Nationers globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og Den Europæiske Unions forordning (EU) 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ([1]). *Øjenirritation* defineres også i overensstemmelse med UN GHS og CLP som frembringelse af forandringer i øjet, der opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade og er fuldt reversible inden for 21 dage efter påføring. Testkemikalier, der medfører alvorlige øjenskader, er klassificeret som UN GHS/CLP-kategori 1, mens kemikalier, der medfører øjenirritation, er klassificeret som UN GHS/CLP-kategori 2. Testkemikalier, der ikke klassificeres for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, defineres på samme måde som de kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. de betegnes som UN GHS/CLP – uden for kategori.

2. Vurderingen af alvorlige øjenskader/øjenirritation har typisk omfattet brug af forsøgsdyr (TM B.5) (2). Valget af den mest egnede forsøgsmetode og anvendelsen af denne forsøgsmetode skal ses i sammenhæng med OECD's vejledende dokument om integrerede tilgange til testning og vurdering for alvorlige øjenskader og øjenirritation (39).

3. Denne forsøgsmetode beskriver en in vitro-procedure, som gør det muligt at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS/CLP. Den gør brug af rekonstrueret humant cornea-lignende epithel (RhCE), som nøje efterligner det humane cornea-epithels histologiske, morfologiske, biokemiske og fysiologiske egenskaber. Fire andre in vitro-forsøgsmetoder er blevet valideret, betragtet som videnskabeligt gyldige og vedtaget som TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) og B.68 (6), hvis effektparameter for menneskers sundhed er alvorlige øjenskader/øjenirritation.

4. To validerede test, der anvender RhCE-modeller, der kan fås i handelen, er inkluderet i denne forsøgsmetode. Der er foretaget valideringsundersøgelser til vurdering af øjenirritation/alvorlige øjenskader (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) under anvendelse af EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) og SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Som testsystem gør hver af disse test brug af RhCE-vævsmodeller, der kan fås i handelen, og

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼M8

som i den følgende tekst omtales som de validerede referencemetoder – henholdsvis VRM 1 og VRM 2. På grundlag af disse valideringsundersøgelser og det uafhængige peer review heraf (9)(12) blev det konkluderet, at EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT kan identificere kemikalier korrekt (både stoffer og blandinger), som ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS, og testene blev anbefalet som videnskabeligt gyldige til det pågældende formål (13).

5. Det er i øjeblikket generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-forsøgsmetode, der fuldt ud vil kunne erstatte in vivo-Draize-øjentesten(2)(14) til forudsigelse af hele spektret af alvorlige øjenskader/øjenirritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i (trinvise) teststrategier såsom bottom-up/top-down-tilgangen kan dog muligvis fuldt ud erstatte Draize-øjentesten (15). Bottom-up-tilgangen (15) er beregnet til at blive anvendt, når et kemikalie på grundlag af eksisterende oplysninger ikke forventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til at kræve en klassificering, mens top-down-tilgangen (15) er beregnet til at blive anvendt, når et kemikalie på grundlag af eksisterende oplysninger forventes at forårsage alvorlige øjenskader. EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT anbefales til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader ifølge UN GHS/CLP (uden for kategori), uden yderligere testning inden for en teststrategi som bottom-up/top-down-tilgangen i henhold til Scott *et al.*, f.eks. som et indledende skridt i bottom-up-tilgangen eller som et af de sidste skridt i top-down-tilgangen (15). EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT er dog ikke beregnet til at kunne sondre mellem UN GHS/CLP-kategori 1 (alvorligeøjenskader) og UN GHS/CLP-kategori 2 (øjenirritation). Denne opdeling vil skulle foretages på et andet trin i teststrategien (15). Et testkemikalie, der med EpiOcular™ EIT eller SkinEthic™ HCE EIT identificeres som et kemikalie, der kræver klassificering for øjenirritation/alvorlige øjenskader, vil således kræve yderligere testning (in vitro og/eller in vivo), for at der kan nås en endelig konklusion (UN GHS/CLP – uden for kategori, kategori 2 eller kategori 1) under anvendelse af f.eks. TM B.47, B.48, B.61 eller B.68.

6. Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive den procedure, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskader baseret på dets evne til at fremkalde en cytotoksisk effekt i et RhCE-væv som målt ved MTT-assayet (16) (jf. punkt 21). RhCE-vævets levedygtighed efter eksponering for et testkemikalie bestemmes ved sammenligning med væv, der behandles med det negative kontrolstof (levedygtighed i %) og anvendes herefter til at forudsige testkemikaliets risiko for at forårsage øjenskade.

7. Der foreligger ydeevnestandarder (17) for at lette valideringen af nye eller ændrede in vitro-RhCE-baserede test, der ligner EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT, i overensstemmelse med OECD's vejledende dokument nr. 34 (18) og give mulighed for rettidig ændring af OECD TG 492, så de kan blive opført heri. Gensidig godkendelse af data i henhold til OECD-aftalen vil kun være garanteret for test, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse test er gennemgået og medtaget i OECD's tilhørende testvejledning.

DEFINITIONER

8. Definitioner findes i tillæg 1.

▼**M8**

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

9. Denne forsøgsmetode er baseret på tredimensionale RhCE-vævsmodeller, som fås i handelen. De er fremstillet ved anvendelse af enten primære humane epidermis-keratinocytter (dvs. EpiOcular™ OCL-200) eller humane udødeliggjorte cornea-epithelceller (dvs. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200- og SkinEthic™ HCE/S-RhCE-vævsmodeller ligner den tredimensionale opbygning af in vivo-cornea-epithel og fremstilles ved hjælp af celler fra relevante arter (19)(20). Endvidere måler testene direkte cytotoksisk effekt som følge af kemikaliets penetration gennem cornea og forårsagelse af celle- og vævsskade. Den cytotoksiske reaktion bestemmer herefter det samlede resultat af alvorlige øjenskader/øjenirritation in vivo. Cellebeskadigelse kan opstå ved flere virkemåder (jf. punkt 20), men cytotoksisk effekt spiller en vigtig, hvis ikke primær, mekanistisk rolle for bestemmelse af den samlede reaktion på et kemikalie i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation, som giver sig udtryk *in vivo*, hovedsagelig ved cornea-uklarhed, iritis, conjunctiva-rødme og/eller conjunctiva-chemosis, uanset hvilke fysisk-kemiske processer, der ligger til grund for vævsbeskadigelsen.

10. En lang række af kemikalier, som dækker en bred vifte af kemiske stoffer, kemikaliegrupper, molekylvægte, LogP'er, kemiske strukturer osv., er blevet testet i den valideringsundersøgelse, som ligger til grund for denne forsøgsmetode. EpiOcular™ EIT-valideringsdatabasen indeholdt 113 kemikalier i alt, der dækker 95 forskellige organiske funktionelle grupper ifølge en analyse af OECD's QSAR-værktøjskasse (8). De fleste af disse kemikalier var stoffer med kun én bestanddel, men flere stoffer med flere bestanddele (bl.a. 3 homopolymerer, 5 copolymerer og 10 kvasi-polymerer) blev også medtaget i undersøgelsen. Med hensyn til fysisk form og UN GHS/CLP-kategorier fordelte de 113 testede kemikalier sig som følger: 13 væsker i kategori 1, 15 faste stoffer i kategori 1, 6 væsker i kategori 2A, 10 faste stoffer i kategori 2A, 7 væsker i kategori 2B, 7 faste stoffer i kategori 2B, 27 væsker uden for kategori og 28 faste stoffer uden for kategori (8). SkinEthic™ HCE EIT-valideringsdatabasen indeholdt 200 kemikalier i alt, der dækker 165 forskellige organiske funktionelle grupper (8)(10)(11). De fleste af disse kemikalier var stoffer med kun én bestanddel, men flere stoffer med flere bestanddele (bl.a. 10 polymerer) blev også medtaget i undersøgelsen. Med hensyn til fysisk form og UN GHS/CLP-kategorier fordelte de 200 testede kemikalier sig som følger: 27 væsker i kategori 1, 24 faste stoffer i kategori 1, 19 væsker i kategori 2A, 10 faste stoffer i kategori 2A, 9 væsker i kategori 2B, 8 faste stoffer i kategori 2B, 50 væsker uden for kategori og 53 faste stoffer uden for kategori (10)(11).

11. Denne forsøgsmetode kan benyttes til test af stoffer og blandinger og faste stoffer, væsker, halvfaste stoffer og vokser. Væskerne kan være vandige eller ikke-vandige, og de faste stoffer kan være vandopløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. Gasser og aerosoler er ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse. Selv om det er tænkeligt, at disse stoffer kan undersøges ved hjælp af RhCE-teknologi, muliggør den nuværende forsøgsmetode ikke undersøgelse af gasser og aerosoler.

12. Testkemikalier, der absorberer lys i det samme område som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), og testkemikalier, som direkte kan interferere med målinger af vævets levedygtighed og reducere vitalfarvestoffet MTT (til MTT-formazan), kan kræve anvendelse af tilpassede kontroller med henblik på korrektioner. Hvilken type af tilpassede kontroller, der kan være nødvendige, varierer alt efter den type interferens, testkemikaliet fremkalder, og den procedure, der benyttes til at kvantificere MTT-formazan (jf. punkt 36-42).

▼**M8**

13. Resultater, der er fremkommet ved undersøgelser til prævalidering (21)(22) og fuld validering (8)(10)(11), har vist, at både EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT kan overføres til laboratorier, der betragtes som uerfarne med gennemførelsen af assays, og også kan reproduceres i og mellem laboratorier. På grundlag af disse undersøgelser er niveauet for reproducerbarhed med hensyn til konkordans i de forudsigelser, der kan forventes af EpiOcular™ EIT vedrørende data om 113 kemikalier, i størrelsesordenen 95 % i laboratorier og 93 % mellem laboratorier. Niveauet for reproducerbarhed med hensyn til konkordans i de forudsigelser, der kan forventes af SkinEthic™ HCE EIT vedrørende data om 120 kemikalier, er i størrelsesordenen 92 % i laboratorier og 95 % mellem laboratorier.

14. EpiOcular™ EIT kan anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. Ud fra de data, der fremgår af valideringsundersøgelsen (8), har EpiOcular™ EIT en samlet nøjagtighed på 80 % (baseret på 112 kemikalier), en følsomhed på 96 % (baseret på 57 kemikalier), en falsk negativ-rate på 4 % (baseret på 57 kemikalier), en specificitet på 63 % (baseret på 55 kemikalier) og en falsk positiv-rate på 37 % (baseret på 55 kemikalier), sammenholdt med referencedata fra in vivo-kaninøjentest (TM B.5) (2)(14), der er klassificeret i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. En undersøgelse, hvor 97 flydende agrokemiske formuleringer blev testet med EpiOcular™ EIT, viste lignende resultater af forsøgsmetoden for denne type blandinger som dem, der blev opnået i valideringsundersøgelsen (23). De 97 formuleringer fordelte sig som følger: 21 i kategori 1, 19 i kategori 2A, 14 i kategori 2B og 43 uden for kategori, klassificeret efter UN GHS-klassificeringssystemet på grundlag af referencedata fra in vivo-kaninøjentesten (TM B.5) (2)(14). Der blev opnået en samlet nøjagtighed på 82 % (baseret på 97 formuleringer), en følsomhed på 91 % (baseret på 54 formuleringer), en falsk negativ-rate på 9 % (baseret på 54 formuleringer), en specificitet på 72 % (baseret på 43 formuleringer) og en falsk positiv-rate på 28 % (baseret på 43 formuleringer) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT kan anvendes til at identificere kemikalier, som ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader efter UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet. Ud fra de data, der fremgår af valideringsundersøgelsen (10)(11), har SkinEthic™ HCE EIT en samlet nøjagtighed på 84 % (baseret på 200 kemikalier), en følsomhed på 95 % (baseret på 97 kemikalier), en falsk negativ-rate på 5 % (baseret på 97 kemikalier), en specificitet på 72 % (baseret på 103 kemikalier) og en falsk positiv-rate på 28 % (baseret på 103 kemikalier), sammenholdt med referencedata fra in vivo-kaninøjentest (TM B.5) (2)(14), der er klassificeret i overensstemmelse med UN GHS- og CLP-klassificeringssystemet.

16. De falsk negativ-rater, som blev opnået med begge RhCE-test for enten stoffer eller blandinger, falder inden for den 12 % samlede sandsynlighed for, at kemikalier identificeres som enten UN GHS/CLP-kategori 2 eller UN GHS/CLP – uden for kategori ved in vivo-Draize-øjentesten i gentagne test. Dette skyldes metodens iboende variabilitet indenfor testen (24). De falsk positive-rater, som blev opnået med begge RhCE-forsøgsmetoder med stoffer eller blandinger, er ikke kritiske i forbindelse med denne forsøgsmetode, eftersom alle testkemikalier, der fremkalder en vævslevedygtighed svarende til eller lavere end de fastsatte tærskelværdier (jf. punkt 44), vil kræve yderligere test med andre in vitro-forsøgsmetoder eller som sidste mulighed hos kaniner alt efter de forskriftsmæssige krav ved anvendelse af en sekventiel

▼M8

teststrategi i en »weight-of-evidence«-analyse. Disse forsøgsmetoder kan anvendes til alle typer af kemikalier, hvor der bør accepteres et negativt resultat, som ikke klassificerer et kemikalie for øjenirritation og alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori). De relevante kompetente myndigheder bør høres, før EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT anvendes i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS/CLP.

17. En begrænsning af denne forsøgsmetode er, at den ikke gør det muligt at sondre mellem øjenirritation/reversible virkninger for øjet (kategori 2) og alvorlige øjenskader/irreversible virkninger for øjet (kategori 1) som defineret i UN GHS og CLP, og heller ikke mellem øjenirriterende stoffer (valgfri kategori 2A) og milde øjenirriterende stoffer (valgfri kategori 2B), som defineret i UN GHS (1). Til disse formål kræves der yderligere testning med andre in vitro-forsøgsmetoder.

18. Betegnelsen »testkemikalie« anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes ([1]), og vedrører ikke RhCE-forsøgsmetodens anvendelighed til testning af stoffer og/eller blandinger.

PRINCIP FOR TESTEN

19. Testkemikaliet påføres lokalt på mindst to tredimensionale RhCE-vævsmodeller, og vævets levedygtighed måles efter eksponering og en inkubationsperiode efter behandling. RhCE-væv rekonstrueres fra primære humane epidermis-keratinocytter eller humane udødeliggjorte cornea-epithelceller, som er blevet dyrket i flere dage, så de danner et lagdelt, stærkt differentieret pladeepithel, som morfologisk ligner det, der findes i den menneskelige cornea. EpiOcular™ RhCE-vævsmodellen består af mindst tre levedygtige cellelag og en ikke-keratiniseret overflade, der udviser en cornea-lignende struktur svarende til den, som findes in vivo. SkinEthic™ HCE RhCE-vævsmodellen består af mindst fire levedygtige cellelag, herunder søjleformede basalceller, midlertidige vingeceller og overfladiske pladeceller svarende til det normale humane cornea-epithel (20)(26).

20. Kemikalieinducerede alvorlige øjenskader/øjenirritation, der in vivo hovedsagelig giver sig udslag i cornea-uklarhed, iritis, conjunctiva-rødme og/eller conjunctiva-chemosis, er en følge af en kaskade af begivenheder, der begynder med kemikaliets penetration gennem cornea og/eller conjunctiva og fremkaldelse af skader på cellerne. Cellebeskadigelse kan opstå ved flere virkemåder, herunder: lysis af cellemembranen (f.eks. ved overfladeaktive stoffer, organiske opløsningsmidler), koagulering af makromolekyler (især proteiner) (f.eks. ved overfladeaktive stoffer, organiske opløsningsmidler, baser og syrer), forsæbning af lipider (f.eks. ved baser) samt alkylering og andre kovalente interaktioner med makromolekyler (f.eks. ved blegemidler, peroxider og alkylatorer) (15)(27)(28). Det er dog blevet påvist, at cytotoksisk effekt spiller en vigtig, om ikke primær, mekanistisk rolle for bestemmelse af den samlede reaktion på et kemikalie i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation, uanset hvilke fysisk-kemiske processer, der ligger til grund for vævsbeskadigelsen (29)(30). Endvidere bestemmes et kemikalies risiko for at forårsage alvorlige øjenskader/øjenirritation primært af omfanget af den indledende skade (31), der hænger sammen med omfanget af celledød (29) og med omfanget af de efterfølgende reaktioner og senere resultater (32). Således påvirker let irriterende stoffer normalt kun corneas overfladeepithel,

([1]) I juni 2013 blev OECD på et fælles møde enig om, at betegnelsen »testkemikalie«, hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede OECD-testvejledninger til at beskrive, hvad det er, der testes.

▼M8

de mildt og moderat irriterende stoffer primært epithelet og stroma i overfladen, mens stærkt øjenirriterende stoffer beskadiger epithelet, dyb stroma og til tider corneas endothel (30)(33). Målingen af RhCE-vævsmodellens levedygtighed efter lokal eksponering for et testkemikalie for at identificere kemikalier, som ikke kræver klassificering for alvorlige øjenskader/øjenirritation (UN GHS/CLP – uden for kategori), er baseret på den antagelse, at alle kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader eller øjenirritation, vil inducere cytotoksisk effekt i cornea-epithelet og/eller conjunctiva.

21. RhCE-vævs levedygtighed måles typisk ved enzymomdannelse af vitalfarvestoffet MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazolium-bromid, CAS-nummer 298-93-1) forårsaget af de levedygtige celler i vævet til et blåt MTT-formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (16). Kemikalier, som ikke kræver klassificering og mærkning efter UN GHS/CLP (uden for kategori), identificeres som kemikalier, der ikke nedsætter vævets levedygtighed under en fastsat tærskel (dvs. vævslevedygtighed > 60 % i EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EITL ([1]) eller > 50 %, i SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (jf. punkt 44).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

22. Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af RhCE-test til lovmæssige formål, bør de påvise deres tekniske kompetence ved korrekt at forudsige de 15 kompetencekemikalier, der er anført i tabel 1. Disse kemikalier blev udvalgt blandt de kemikalier, som anvendes i valideringsundersøgelserne af VRM'er (8)(10)(11). De udvalgte kemikalier omfatter så vidt muligt kemikalier, der: (i) dækker forskellige fysiske former, ii) dækker det fulde spektrum af in vivo-reaktioner i form af alvorlige øjenskader/øjenirritation baseret på resultater af høj kvalitet opnået ved in vivo-kaninøjentesten som reference (TM B.5) (2)(14) og UN GHS-klassificeringssystemet (dvs. kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (1) og CLP-klassificeringssystemet (dvs. kategori 1, 2 eller uden for kategori), (iii) dækker de forskellige in vivo-klassificeringsfaktorer (24)(25), (iv) er repræsentative for de kemikaliegrupper, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen (8)(10)(11), (v) dækker et godt og bredt udsnit af organiske funktionelle grupper (8)(10)(11), vi) har veldefinerede kemiske strukturer (8)(10)(11), (vii) er farvede og/eller direkte MTT-opløsninger, (viii) gav reproducerbare resultater ved RhCE-forsøgsmetoderne under valideringer af dem, (ix) blev korrekt forudset ved RhCE-forsøgsmetoderne under valideringsundersøgelsen af dem, (x) dækker det fulde spektrum af in vitro-reaktioner baseret på data af høj kvalitet om RhCE-forsøgsmetoder (0-100 % levedygtighed), xi) findes i handelen og xii) ikke er forbundet med uoverkommelige anskaffelses- og/eller bortskaffelsesomkostninger. Hvis et stof på listen ikke kan fås eller af andre gyldige grunde ikke kan anvendes, kan der anvendes et andet kemikalie, som opfylder ovennævnte kriterier, f.eks. blandt de kemikalier, der blev anvendt ved valideringen af VRM. Sådanne afvigelser bør dog begrundes.

([1]) EITL: EIT til væsker ved anvendelse af SkinEthic™ HCE.
([2]) EITS: EIT til faste stoffer ved anvendelse af SkinEthic™ HCE.

▼M8

Tabel 1

Liste over kompetencekemikalier

Kemisk betegnelse	CAS RN	Organisk funktionel gruppe (1)	Fysisk form	VRM1-levedygtighed (%) (2)	VRM2-levedygtighed (%) (3)	VRM-forudsigelse	MTT-reduktionsmiddel	Farveinterf.
***In vivo*-kategori 1** (4)								
Methylthioglycolat	2365-48-2	Carboxylsyre-ester, thioalkohol	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	Y (stærk)	N
Hydroxyethylacrylat	818-61-1	Acrylat, alkohol	L	7,5 ± 4,7 (5)	1,6 ± 1,0	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
2,5-dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	alkohol	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxocarboxylsyre	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
***In vivo*-kategori 2A** (4)								
2,4,11,13-tetraazatetradecandiimidamid, N,N″-bis(4-chlorphenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconat (20 %, vandig) (6)	18472-51-0	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalogenid, dihydroxylgruppe, guanidin	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	Y (svag)
Natriumbenzoat	532-32-1	Aryl, carboxylsyre	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
***In vivo*-kategori 2B** (4)								
Diethyltoluamid	134-62-3	Benzamid	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
2,2-dimethyl-3-methylenbicyclo [2.2.1] heptan	79-92-5	Forgrenet alkan med tertiært kulstof, alken, bicycloheptan, forbundne kulstofringe, cycloalkan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser	N	N
***In vivo* Uden for kategori** (4)								
1-ethyl-3-methylimidazolethylsulfat	342573-75-5	Alkoxy, ammoniumsalt, aryl, imidazol, sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Uden for kat.	N	N

▼M8

Kemisk betegnelse	CAS RN	Organisk funktionel gruppe (1)	Fysisk form	VRM1-levedygtighed (%) (2)	VRM2-levedygtighed (%) (3)	VRM-forudsigelse	MTT-reduktionsmiddel	Farveinterf.
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy, Ether	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Uden for kat.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxy, benzodioxol, benzyl, Ether	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Uden for kat.	N	N
Polyethylenglycol (PEG-40)-hydrogeneret ricinusolie	61788-85-0	Acylal, alkohol, allyl, Ether	Viskøs	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Uden for kat.	N	N
1-(4-chlorphenyl)-3-(3,4-dichlorphenyl)-urinstof	101-20-2	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalogenid, urinstofderivater	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Uden for kat.	N	N
2,2′-methylen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)	103597-45-1	Forgrenet alkan med kvartært kulstof, smeltede carbocykliske forbindelser, aromatiske, smeltede mættede heterocykliske forbindelser, prækursorer quinoide forbindelser, tert-butyl	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Uden for kat.	N	N
Kalium-tetrafluorborat	14075-53-7	Uorganisk salt	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Uden for kat.	N	N

Forkortelser:

CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service UN GHS = De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (1), VRM1 = valideret referencemetode, EpiOcular™ EIT, VRM2 = valideret referencemetode, SkinEthic™ HCE EIT, Farveinterf. = farveinterferens med måling af standardabsorbans (optisk densitet (OD)) af MTT-formazan.

(1) Organisk funktionel gruppe tildelt efter en nested analyse ifølge en OECD-værktøjskasse 3.1 (8).

(2) Baseret på resultater opnået med EpiOcular™ EIT i EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

(3) Baseret på resultater opnået med SkinEthic™ HCE EIT i valideringsundersøgelsen (10)(11).

(4) Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TM B.5/OECD TG 405) (2)(14) og ved anvendelse af UN GHS.

(5) Baseret på resultater opnået i CEFIC CONsortiums in vitro-undersøgelse Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

(6) Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for sondring mellem disse to kategorier, dvs. 1 dyr ud af 3 mod 2 dyr ud af 3 med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at generere en kategori 2A-klassificering. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle effektparametre bortset fra cornea-uklarhed hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Det ene dyr, som ikke kom sig fuldt ud inden dag 7, havde en cornea-uklarhed på 1 (på dag 7) og opnåede fuld bedring på dag 9.

23. Som led i påvisningen af kompetence anbefales det, at brugere kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet af producenten af RhCE-vævsmodellen (jf. punkt 25, 27 og 30). Dette er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lange afstande/er længe undervejs. Når en test er helt fastlagt, og kompetencen med hensyn til brugen heraf erhvervet og påvist, vil denne rutinemæssige kontrol ikke være nødvendig. Når en test benyttes rutinemæssigt, anbefales det dog fortsat at vurdere barriereegenskaberne med regelmæssige mellemrum.

▼M8

FREMGANGSMÅDE

24. De test, der i øjeblikket er dækket af denne forsøgsmetode, er de videnskabeligt validerede EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), der omtales som de validerede referencemetoder (henholdsvis VRM1 og VRM2). Standardprocedurer for RhCE-forsøgsmetoderne er tilgængelige og bør anvendes ved gennemførelse og brug af forsøgsmetoderne i et laboratorium (34)(35). Følgende punkter og tillæg 2 indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i RhCE-testene.

KOMPONENTERNE I RHCE-FORSØGSMETODEN

Almindelige betingelser

25. Relevante humant afledte celler bør anvendes til at rekonstruere cornea-lignende tredimensionalt epithelvæv, som bør bestå af gradvist lagdelte, men ikke forhornede celler. RhCE-vævsmodellen præpareres i indsatser med en porøs syntetisk membran, som næringsstoffer kan passere igennem til cellerne. Der bør være flere lag levedygtige, ikke-keratiniserede epithelceller til stede i det rekonstruerede cornea-lignende epithel. RhCE-vævsmodellens epitheloverflade skal have direkte luftkontakt, så der kan ske direkte lokal eksponering for testkemikalierne på en måde, der ligner den måde, hvorpå cornea-epithelet vil være eksponeret in vivo. RhCE-vævsmodellen skal danne en tilstrækkeligt robust funktionel barriere til at kunne modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske referencestoffer, f.eks. Triton X-100 eller natriumdodecylsulphat (SDS). Barrierefunktionen påvises og kan vurderes ved at bestemme enten den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte vævets levedygtighed med 50 % (ET_{50}) efter påføring af et referencestof ved en fastsat koncentration (f.eks. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100) eller den koncentration, hvorved et referencestof nedsætter vævenes levedygtighed med 50 % (IC_{50}) efter en fastsat eksponeringstid (f.eks. 30 minutters behandling med 50 µl SDS) (jf. punkt 30). RhCE-vævsmodellens fysiske udformning skal forhindre, at testkemikaliet passerer uden om kanten af det levedygtige væv, hvilket kan forringe modelleringen af eksponeringen af cornea. De humant afledte celler, der anvendes til at opbygge RhCE-vævsmodellen, skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe. Leverandøren skal kontrollere vævsmodellens sterilitet for fravær af kontaminering med svampe og bakterier.

Funktionsmæssige betingelser

Levedygtighed

26. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af vævslevedygtigheden (16). Levedygtige celler i RhCE-vævsmodellen reducerer vitalfarvestoffet MTT til blåt MTT-formazanbundfald, som herefter ekstraheres fra vævet ved anvendelseaf isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel). Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres ved anvendelse af enten måling af en standardabsorbans (optisk densitet (OD)) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure (36). OD af ekstraktionsmidlet alene bør være tilstrækkeligt lille, dvs. OD < 0,1. Brugere af RhCE-vævsmodellen skal sikre, at hver batch af den anvendte RhCE-vævsmodel overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol. Intervaller for de acceptable OD-værdier til negativ kontrol for VRM'er er anført i tabel 2. En bruger af HPLC/UPLC-spektrofotometri bør som acceptkriterie for den negative kontrol anvende de OD-intervaller til negativ kontrol, der er anført i tabel 2. Det skal i testrapporten godtgøres, at vævet fra behandling med det negative kontrolstof er en stabil kultur (giver enslydende målinger af vævslevedygtighed) i hele testeksponeringsperioden. En lignende procedure bør følges af vævsproducenten

▼M8

som led i kvalitetskontrollen ved godkendelse af en vævsbatch, men i dette tilfælde kan andre godkendelseskriterier end dem, der er anført i tabel 2, finde anvendelse. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fastsætte et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (i betingelserne for kvalitetskontrol af forsøgsmetoden).

Tabel 2

Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (for testbrugere)

Test	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (for protokoller for både væsker og faste stoffer)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (for protokoller for både væsker og faste stoffer)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Denne acceptgrænse tager højde for mulig langvarig forsendelse/opbevaringstid (f.eks. > 4 dage), som har vist sig ikke at påvirke forsøgsmetodens resultater (37).

Barrierefunktion

27. RhCE-vævsmodellen skal være tilstrækkeligt tyk og robust til at kunne modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske referencestoffer, som anslået af f.eks. ET_{50} (Triton X-100) eller IC_{50} (SDS) (tabel 3). Udvikleren/leverandøren af den anvendte RhCE-vævsmodel skal påvise barrierefunktionen for hver enkelt batch af RhCE-vævsmodellen ved levering af vævene til slutbrugeren (jf. punkt 30).

Morfologi

28. En histologisk undersøgelse af RhCE-vævsmodellen skal påvise en human cornea-lignende epithelstruktur (bl.a. mindst tre lag levedygtige epithelceller og en ikke-keratiniseret overflade). For VRM'er har udvikleren/leverandøren fastlagt passende morfologi, og den behøver derfor ikke påvises igen af brugeren af en forsøgsmetode for hver enkelt anvendt vævsbatch.

Reproducerbarhed

29. Resultaterne af forsøgsmetoden med positive og negative kontroller skal vise tidsmæssig reproducerbarhed.

Kvalitetskontrol

30. RhCE-vævsmodellen bør kun anvendes, hvis udvikleren/leverandøren påviser, at hver batch af den anvendte RhCE-vævsmodel overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf levedygtighed (punkt 26) og barrierefunktion (punkt 27) er de vigtigste. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fastsætte et interval for acceptable værdier (øvre og nedre grænser) for barrierefunktionerne som målt ved ET_{50} eller IC_{50} (jf. punkt 25 og 26). De ET_{50}- og IC_{50}-godkendelsesintervaller, som udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodeller (anvendt i VRM'er) som kriterie for batchfrigivelse, er angivet i tabel 3. Udvikleren/leverandøren af RhCE-vævsmodellen skal fremlægge data, der dokumenterer overensstemmelse med alle produktionsgodkendelseskriterier, for brugere af forsøgsmetoden, således at disse kan medtage de pågældende oplysninger i testrapporten. Kun resultater, som er opnået med væv, der opfylder alle disse kriterier for produktionsgodkendelse, kan accepteres til at give en pålidelig vurdering af kemikalier, som ikke kræver klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader i overensstemmelse med UN GHS/CLP.

▼M8

Tabel 3

Kriterium for batchgodkendelse ved kvalitetskontrol

Test	Nedre acceptgrænse	Øvre acceptgrænse
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minutters behandling med 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Påføring af testkemikalie og kontrolstoffer

31. Der anvendes mindst to vævsgentagelser for hvert testkemikalie og hvert kontrolstof i hver analyseserie. Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller, en for flydende testkemikalier og en for faste testkemikalier (34)(35). For begge metoder og protokoller fugtes vævsmodellens overflade med kalcium- og magnesiumfrit Dulbeccos phosphatbufret fysiologisk saltopløsning (Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS) før påføring af testkemikalier for at efterligne fugtbetingelserne i det menneskelige øje. Vævsbehandlingen indledes med eksponering for testkemikalie(r) og kontrolstoffer. For begge behandlingsprotokoller i de to VRM'er påføres en tilstrækkelig mængde testkemikalie eller kontrolstof til, at epitheloverfladen dækkes med et jævnt lag, og der samtidig undgås en ubegrænset dosis (jf. punkt 32 og 33) (tillæg 2).

32. Testkemikalier, der kan pipetteres ved 37 °C eller lavere temperaturer (om nødvendigt ved hjælp af en pipette med positiv fortrængning), behandles som væsker i VRM'erne, og ellers som faste stoffer (jf. punkt 33). I VRM'erne fordeles testkemikaliet jævnt over vævsoverfladen (dvs. en påføring på minimum 60 µl/cm^2) (jf. tillæg 2, (33)(34)). De kapillarvirkninger (virkninger på overfladespændingen), som kan opstå på grund af de lave volumener, der påføres indsatsen (på vævets overflade), bør så vidt muligt undgås for at sikre korrekt dosering af vævet. Væv, der behandles med flydende testkemikalier, inkuberes i 30 minutter under standarddyrkningsbetingelser (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Ved afslutningen af eksponeringsperioden fjernes det flydende testkemikalie og kontrolstofferne forsigtigt fra vævsoverfladen ved skylning med rigelig Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS ved stuetemperatur. Dette skylletrin følges af nedsænkning i frisk dyrkningsmedium ved stuetemperatur (for at fjerne testkemikalie, der eventuelt er absorberet i vævet) i en forud fastsat periode, som varierer alt efter den anvendte VRM. Kun for VMR1 anvendes en inkubation efter eksponering i frisk dyrkningsmedium under standarddyrkningsbetingelser før udførelsen af MTT-assayet (jf. tillæg 2, (34)(35)).

33. Testkemikalier, som ikke kan pipetteres ved temperaturer op til 37 °C, behandles som faste stoffer i VRM'er. Mængden af testkemikalie skal være tilstrækkelig til at dække hele vævets overflade, dvs. at der bør påføres mindst 60 mg/cm^2 (tillæg 2). Når det er muligt, bør faste stoffer testes som fint pulver. Væv, der behandles med faste testkemikalier, inkuberes i en forud fastsat periode (afhængigt af den anvendte VRM) under standarddyrkningsbetingelser (jf. tillæg 2, (34)(35)). Ved afslutningen af eksponeringsperioden fjernes det faste testkemikalie og kontrolstofferne

▼M8

forsigtigt fra vævsoverfladen ved skylning med rigelig Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS ved stuetemperatur. Dette skylletrin følges af en nedsænkning i frisk dyrkningsmedium ved stuetemperatur efter eksponering (for at fjerne testkemikalie, der eventuelt er absorberet i vævet) i en forud fastsat periode, som varierer alt efter den anvendte VRM, og en inkubation i frisk medium under standarddyrkningsbetingelser, før MTT-assayet udføres (jf. tillæg 2 (34)(35)).

34. Sideløbende negative og positive kontroller bør medtages i hver analyseserie for at påvise, at vævenes levedygtighed (bestemt med den negative kontrol) og følsomhed (bestemt med den positive kontrol) ligger inden for de acceptintervaller, som defineres på grundlag af tidligere data. Den sideløbende negative kontrol giver også referencen (100 % vævslevedygtighed) til at beregne den relative procentvise levedygtighed for de væv, der behandles med testkemikaliet (% levedygtigheds_{test}). Det anbefalede positive kontrolstof, der skal anvendes med VRM'erne, er ren methylacetat (CAS-nr. 79-20-9, fås i handelen fra f.eks. Sigma-Aldrich, Cat# 45997, væske). De anbefalede negative kontrolstoffer, der skal anvendes med VRM1 og VRM2, er ultrarent henholdsvis H_2O- og Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS. Det var disse kontrolstoffer, der blev anvendt i valideringsundersøgelserne af VRM'erne, og det er dem, de fleste tidligere data foreligger for. Anvendelsen af egnede alternative positive eller negative kontrolstoffer skal være tilstrækkeligt videnskabeligt begrundet. Negative og positive kontroller bør testes med de(n) samme protokol(ler) som dem, der benyttes for de testkemikalier, der er medtaget i analyseserien (dvs. for væsker og/eller faste stoffer). Denne anvendelse bør følges af eksponering for behandlingen, skylning, nedsænkning efter eksponering og eventuelt inkubation efter eksponering som beskrevet for kontroller, som gennemføres sideløbende med flydende testkemikalier (jf. punkt 32) eller for kontroller, der gennemføres sideløbende med faste testkemikalier (jf. punkt 33), før MTT-assayet udføres (jf. punkt 35) (34)(35)). En enkelt række negative og positive kontroller er tilstrækkelig for alle testkemikalier med samme fysiske form (væsker eller faste stoffer), der medtages i den samme analyseserie.

Måling af vævslevedygtighed

35. MTT-assayet er en standardiseret kvantitativ metode (16), som skal benyttes til måling af vævslevedygtighed i forbindelse med denne forsøgsmetode. Den er forenelig med brug i en tredimensional vævsmodel. MTT-assayet udføres straks efter inkubationstiden efter eksponering. I VRM'er anbringes RhCE-vævsmodelprøven i 0,3 ml MTT-opløsning til 1 mg/ml i 180 ± 15 minutter under standarddyrkningsbetingelser. Vitalfarvestoffet MTT reduceres til blåt MTT-formazanbundfald af de levedygtige celler i RhCE-vævsmodellen. Det udfældede blå MTT-formazan ekstraheres herefter fra vævet ved hjælp af en passende mængde isopropanol (eller et lignende opløsningsmiddel) (34) (35). Væv, der testes med flydende testkemikalier, bør ekstraheres både fra vævenes top og bund, mens væv, der testes med faste testkemikalier og farvede væsker, kun ekstraheres fra vævets bund (for at minimere potentiel kontaminering af isopropanol-ekstraktionsopløsningen med testkemikalie, som måske er forblevet på vævet. Væv, der testes med flydende testkemikalier, som ikke med det samme vaskes af, kan også ekstraheres fra vævets bund alene. De negative og positive kontrolstoffer, der testes samtidig, bør behandles på samme måde som det testede kemikalie. Det ekstraherede MTT-formazan kan kvantificeres enten ved en måling af standardabsorbans (OD) ved anvendelse af et højst ± 30 nm bredt filterbånd ved 570 nm eller ved anvendelse af en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure (jf. punkt 42) (11)(36).

▼**M8**

36. Testkemikaliets optiske egenskaber eller dets kemiske reaktion med MTT kan interferere med målingen af MTT-formazan og føre til et forkert skøn over vævslevedygtigheden. Testkemikalier kan interferere med målingen af MTT-formazan ved direkte reduktion af MTT til blåt MTT-formazan og/eller ved farveinterferens, hvis testkemikaliet naturligt eller på grund af behandlingsprocedurer absorberer i det samme absorbansinterval som MTT-formazan (dvs. omkring 570 nm). Der bør udføres forudgående kontroller før testning for at identificere potentielle direkte MTT-reduktionsmidler og/eller kemikalier, som fremkalder farveinterferens, og der bør udføres supplerende kontroller for at spore og korrigere for potentiel interferens fra sådanne testkemikalier (jf. punkt 37-41). Dette er især vigtigt, når et bestemt testkemikalie ikke er helt fjernet fra RhCE-vævsmodellen ved skylning, eller når det gennemtrænger det cornea-lignende epithel og derfor er til stede i RhCE-vævsmodellerne, når MTT-assayet er udført. For testkemikalier, der absorberer lys i det samme interval som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), som ikke er kompatibelt med måling af standardabsorbans (OD) af MTT-formazan på grund af for stærk interferens, dvs. stærk absorption ved 570 ± 30 nm, kan der benyttes en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure til at måle MTT-formazan (jf. punkt 41 og 42) (11)(36). Det er nærmere beskrevet i SOP'erne for VRM'erne, hvordan man sporer og korrigerer for direkte MTT-reduktion og farvestoffernes interferens (34)(35). I henholdsvis tillæg III og IV findes der også illustrative flowdiagrammer over, hvordan man identificerer og håndterer direkte MTT-opløsninger og/eller farveinterfererende kemikalier for VRM1 og VRM2.

37. For at identificere den potentielle interferens fra testkemikalier, der absorberer lys i det samme interval som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling), og afgøre, om der er behov for yderligere kontrol, tilsættes testkemikaliet til vand og/eller isopropanol og inkuberes i en passende tid ved stuetemperatur (jf. tillæg 2, (34) (35)). Hvis testkemikaliet i vand og/eller isopropanol absorberer tilstrækkeligt lys i intervallet 570 ± 20 nm til VRM1 (jf. tillæg 3), eller hvis en farvet opløsning opnås ved blanding af testkemikaliet med vand til VRM2 (jf. tillæg 4), antages testkemikaliet at interferere med målingen af standardabsorbansen (OD) for MTT-formazan, og der bør foretages yderligere farvestofkontrol, eller alternativt bør der anvendes en HPLC/UPLC-spektrofotometriprocedure, og i så fald er disse kontroller ikke nødvendige (jf. punkt 41 og 42 og tillæg III og IV) (34)(35). Når der foretages en måling af standardabsorbansen (OD), påføres hvert interfererende testkemikalie på mindst to levedygtige vævsgentagelser, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med dyrkningsmedium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet for at generere en kontrol af en ikke-specifik farve i levende væv (NSC_{living}) (34)(35). NSC_{living}-kontrollen skal udføres sideløbende med testningen af det farvede testkemikalie, og i tilfælde af flere test skal der foretages en uafhængig NSC_{living}-kontrol for hver test, der udføres (i hver analyseserie) på grund af den iboende biologiske variabilitet i levende væv. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med MTT-opløsning (% $levedygtigheds_{test}$) minus den procentvise ikke-specifik farve opnået med levende væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med medium uden MTT kørt samtidig med den test, der korrigeres (% NSC_{living}), dvs. korrekt vævslevedygtighed = [% $levedygtigheds_{test}$] - [% NSC_{living}].

38. For at identificere direkte MTT-reduktionsmidler bør hvert testkemikalie tilsættes til en frisklavet MTT-opløsning. En passende mængde testkemikalie tilsættes til en MTT-opløsning, og blandingen inkuberes i ca. tre timer under

▼**M8**

standarddyrkningsbetingelser (jf. tillæg III og IV) (34)(35). Hvis MTT-blandingen, der indeholder testkemikaliet (eller suspension til uopløselige testkemikalier), bliver blå/violet, antages testkemikaliet direkte at reducere MTT, og der bør foretages en yderligere funktionskontrol på ikke-levedygtige RhCE-vævsmodeller uafhængigt af anvendelsen af målingen af standardabsorbans (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometri-procedure. Ved denne supplerende funktionskontrol anvendes dødt væv, hvor der kun er metabolisk residualaktivitet, men absorberer og tilbageholder testkemikaliet på samme måde som levedygtigt væv. Dødt væv under VRM1 præpareres ved eksponering for lav temperatur (»freeze-killed«). Dødt væv under VRM2 præpareres ved langvarig inkubation (f.eks. i mindst 24 ± 1 timer) i vand efterfulgt af opbevaring ved lave temperatur (»water-killed«). Hvert MTT-reducerende testkemikalie påføres på mindst to døde vævsgentagelser, som gennemgår hele testproceduren for at generere en ikke-specifik MTT-reduktionskontrol (NSMTT) (34)(35). En enkelt NSMTT-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyseserier der udføres. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed, der opnås med levende væv, som eksponeres for MTT-reduktionsmidlet (% levedygtigheds$_{test}$) minus den procentvise ikke-specifikke MTT-reduktion, der opnås med det døde væv, som udsættes for det samme MTT-reduktionsmiddel, beregnet i forhold til den negative kontrol, der foretages sideløbende med den test, der korrigeres (% NSMTT), dvs. den faktiske vævslevedygtighed = [% levedygtigheds$_{test}$] - [% NSMTT].

39. Testkemikalier, der identificeres som kemikalier, der fremkalder både farveinterferens (jf. punkt 37) og direkte MTT-reduktion (jf. punkt 38), vil også kræve et tredje sæt kontroller, når målingen af standardabsorbansen (OD) udføres, ud over NSMTT- og NSC$_{living}$-kontrollerne, der er beskrevet ovenfor. Dette er sædvanligvis tilfældet med mørke testkemikalier, der absorberer lys i intervallet 570 ± 30 nm (f.eks. blå, violette, sorte), fordi deres egen farve forstyrrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT, som beskrevet i punkt 38. Dette nødvendiggør anvendelsen af NSMTT-kontroller som standard sammen med NSC$_{living}$-kontroller. Testkemikalier, for hvilke der udføres både NSMTT- og NSC$_{living}$-kontroller, kan blive absorberet og tilbageholdt af både levende og dødt væv. Derfor kan NSMTT-kontrollen i dette tilfælde ikke blot korrigere for testkemikaliets potentielle direkte MTT-reduktion, men også for den farveinterferens, der opstår, når testkemikaliet absorberes og tilbageholdes af dødt væv. Dette kan medføre dobbeltkorrektion for farveinterferens, da NSC$_{living}$-kontrollen allerede korrigerer for farveinterferens, som opstår, når testkemikaliet absorberes og tilbageholdes af levende væv. For at undgå eventuel dobbeltkorrektionfor farveinterferens skal der gennemføres en tredje kontrol for ikke-specifik farve i dødt væv (NSC$_{killed}$) (jf. tillæg III og IV) (34)(35). I denne yderligere kontrol påføres testkemikaliet på mindst to døde vævsprøver, som gennemgår hele testproceduren, men inkuberes med dyrkningsmedium i stedet for MTT-opløsning under MTT-inkubationstrinnet. En enkelt NSC$_{killed}$-kontrol er tilstrækkelig pr. testkemikalie, uanset hvor mange uafhængige test/analyseserier der er udført, men bør udføres sideløbende med NSMTT-kontrollen og med den samme vævsbatch. En korrekt vævslevedygtighed beregnes som: den procentvise vævslevedygtighed opnået med levende væv eksponeret for testkemikaliet (% levedygtigheds$_{test}$) minus % NSMTT minus % NSC$_{living}$ plus den procentvise ikke-specifikke farve opnået med dødt væv eksponeret for det interfererende testkemikalie og inkuberet med dyrkningsmedium uden MTT beregnet i forhold til den negative kontrol, som gennemføres samtidig med den test, der korrigeres (% NSC$_{killed}$), dvs. korrekt vævslevedygtighed = [% levedygtigheds$_{test}$] - [% NSMTT] - [% NSC$_{living}$] + [% NSC$_{killed}$].

▼M8

40. Det er vigtigt at bemærke, at en ikke-specifik MTT-reduktion og ikke-specifik farveinterferens kan øge vævsekstraktets OD (når der udføres målinger af standardabsorbans) over spektrofotometrets linearitetsinterval, og at ikke-specifik MTT-reduktion også kan øge vævsekstraktets topareal for MTT-formazan (ved udførelse af HPLC/UPLC-målinger ved hjælp af spektrofotometri) over spektrofotometrets linearitetsinterval. På dette grundlag er det vigtigt for hvert laboratorium at bestemme linearitetsintervallet for deres spektrofotometers OD/topareal med f.eks. MTT-formazan (CAS # 57360-69-7), som fås i handelen fra f.eks. Sigma-Aldrich (Cat# M2003), før der indledes testning af testkemikalier til lovmæssige formål.

41. Måling af standardabsorbans (OD) ved hjælp af et spektrofotometer er hensigtsmæssig til at vurdere direkte MTT-opløsningsmidler og farveinterfererende testkemikalier, når den observerede interferens med måling af MTT-formazan ikke er for stærk (dvs. OD-værdierne af vævsekstrakter opnået med testkemikaliet uden nogen korrektion for direkte MTT-reduktion og/eller farveinterferens ligger inden for spektrofotometrets lineære interval). Ikke desto mindre bør resultater for testkemikalier, som producerer % NSMTT og/eller % $NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1 og VRM2 for væskeprotokol) eller 50 % (VRM2 for faste stoffers protokol), af den negative kontrol tages med forsigtighed, da dette er den fastlagte tærskelværdi, som anvendes i VRM'erne for at skelne mellem klassificerede og ikke-klassificerede kemikalier (jf. punkt 44). Standardabsorbans (OD) kan dog ikke måles, når interferensen med målingen af MTT-formazan er for stærk (*dvs*. fører til ukorrigerede OD-værdier for testvævsekstrakten, som falder uden for spektrofotometrets lineære interval). Farvede testkemikalier eller testkemikalier, som bliver farvede i kontakt med vand eller isopropanol, der interfererer for stærkt med målingen af standardabsorbans (OD) af MTT-formazan, kan stadig vurderes ved anvendelse af HPLC/UPLC-spektrofotometri (jf. tillæg III og IV). Dette skyldes, at HPLC/UPLC-systemet giver mulighed for at separere MTT-formazan fra kemikaliet, før det kvantificeres (36). Af denne grund kræves NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller aldrig, når der anvendes HPLC/UPLC-spektrofotometri uafhængigt af det testede kemikalie. NSMTT-kontroller bør ikke desto mindre benyttes, hvis testkemikaliet mistænkes for direkte at reducere MTT (efter proceduren i punkt 38). NSMTT-kontroller bør også benyttes med testkemikalier, der har en farve (deres egen eller en farve, der kommer frem i vand), som forhindrer vurderingen af deres evne til direkte at reducere MTT som beskrevet i punkt 38. Ved benyttelse af HPLC/UPLC-spektrofotometri til at måle MTT-formazan beregnes den procentvise vævslevedygtighed som en procentdel af toparealet for MTT-formazan, der opnås med levende væv, som eksponeres for testkemikaliet i forhold til toparealet for MTT formazan opnået med den sideløbende negative kontrol. For testkemikalier, der direkte kan reducere MTT, beregnes korrekt vævslevedygtighed som: % $levedygtigheds_{test}$ minus % NSMTT som beskrevet i den sidste sætning i punkt 38. Endelig bør det bemærkes, at direkte MTT-opløsninger eller direkte MTT-opløsningsmidler, der også er farveinterfererende, og som tilbageholdes i vævet efter behandling og reducerer MTT så stærkt, at de fører til OD-værdier (ved anvendelse måling af standard-OD) eller toparealer (ved anvendelse af UPLC/HPLC-spektrofotometri) for de testede vævsekstrakter, som falder uden for spektrofotometrets linearitetsinterval, ikke kan vurderes med RhCE-forsøgsmetoder, skønt disse kun forventes at opstå i meget sjældne situationer.

42. HPLC/UPLC-spektrofotometri kan anvendes med alle typer af testkemikalier (farvede, ikke-farvede, MTT-opløsninger og opløsninger uden MTT) til måling af MTT-formazan (11)(36). På grund af de mange forskellige HPLC/UPLC-spektrofotometri-systemer er det ikke muligt for den enkelte bruger at

▼M8

skabe nøjagtig de samme betingelser. Kvalificeringen af HPLC/UPLC-spektrofotometrisystemet bør som sådan påvises, før det anvendes til at kvantificere MTT-formazan fra vævsekstrakter ved at opfylde acceptkriterierne til en række parametre for standardkvalificering baseret på dem, der er beskrevet i retningslinjerne for industrien om bioanalytisk metodevalidering fra den amerikanske Food and Drug Administration (FDA) (36)(38). Disse centrale parametre og deres acceptkriterier er vist i tillæg 5. Når acceptkriterierne i tillæg 5 er blevet opfyldt, anses HPLC/UPLC-spektrofotometrisystemet for at være kvalificeret og klar til at måle MTT-formazan under de forsøgsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode.

Acceptkriterier

43. For hver analyseserie, hvor der anvendes RhCE-vævsbatcher, som opfylder kvalitetskontrollen (jf. punkt 30), skal væv behandlet med det negative kontrolstof give OD-resultater, der afspejler kvaliteten af de væv, som har gennemgået alle forsendelses- og modtagelsestrin og alle protokolprocesser, og må ikke ligge uden for de tidligere fastsatte grænser som beskrevet i tabel 2 (jf. punkt 26). På tilsvarende måde skal væv, der behandles med det positive kontrolstof, dvs. methylacetat, udvise en gennemsnitlig vævslevedygtighed på < 50 % i forhold til den negative kontrol ved VRM1 med protokollen for enten flydende eller faste stoffer og ≤ 30 % (protokollen for væsker) eller ≤ 20 % (protokollen for faste stoffer) i forhold til den negative kontrol ved VRM2 og således afspejle vævenes evne til at reagere på et lokalirriterende testkemikalie under forsøgsmetodens vilkår (34)(35). Variabiliteten mellem vævsprøver af testkemikalier og kontrolstoffer skal ligge inden for de accepterede grænser (dvs. at forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver skal ligge under 20 %, eller standardafvigelsen mellem tre vævsprøver må ikke overstige 18 %). Hvis enten den negative kontrol eller positive kontrol i en analyseserie ligger uden for de accepterede intervaller, anses analyseserien for »ikke-kvalificeret« og bør gentages. Hvis variabiliteten mellem vævsprøver for et testkemikalie ligger uden for de accepterede intervaller, skal testen anses for at være »ikke-kvalificeret«, og testkemikaliet skal testes igen.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

44. OD-værdier/toparealer opnået med vævsekstraktprøven for hvert testkemikalie anvendes til at beregne den gennemsnitlige vævslevedygtighed i procent (gennemsnit mellem vævsprøver) normaliseret til den negative kontrol, som fastsættes til 100 %. Tærskelværdien for den procentvise vævslevedygtighed for identifikation af testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP – uden for kategori), er anført i tabel 4. Resultaterne skal således fortolkes som følger:

— Testkemikaliet identificeres således, at det ikke kræver klassificering og mærkning ifølge UN GHS/CLP (uden for kategori), hvis den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter eksponering ligger over (>) tærskelværdien af den fastsatte procentvise vævslevedygtighed som vist i tabel 4. I så fald kræves der ingen yderligere testning efter andre forsøgsmetoder.

▼M8

— Såfremt den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed efter eksponering og inkubation efter eksponering ligger under eller er lig med (≤) tærskelværdien for den fastsatte procentvise vævslevedygtighed, kan der ikke fremsættes nogen forudsigelse, som det fremgår af tabel 4. I så fald vil yderligere testning efter andre forsøgsmetoder være påkrævet, fordi RhCE-forsøgsmetoderne viser et vist antal falsk positive resultater (jf. punkt 14-15) og ikke kan ende mellem UN GHS/CLP-kategori 1 og 2 (jf. punkt 17).

Tabel 4

Forudsigelsesmodeller ifølge UN GHS- og CLP-klassificering

VRM	Uden for kategori	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (for begge protokoller)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 60 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (for protokollen for væsker)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 60 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (for protokollen for faste stoffer)	Gennemsnitlig vævslevedygtighed > 50 %	Gennemsnitlig vævslevedygtighed ≤ 50 %

45. En enkelt test bestående af mindst to vævsprøver bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når resultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger, og/eller hvis den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed er 60 ± 5 % (VRM1 og VRM2 for protokollen for væsker) eller 50 ± 5 % (VRM2 for protokollen for faste stoffer), skal det dog overvejes at foretage en anden test samt en tredje, hvis resultaterne af de første to test er diskordante.

46. Forskellige tærskelværdier for procentvis vævslevedygtighed, der adskiller klassificerede og ikke-klassificerede testkemikalier, kan overvejes for specifikke typer blandinger, hvis det er passende og begrundet, med henblik på at øge forsøgsmetodens samlede resultater for de pågældende typer blandinger (jf. punkt 14). Referencekemikalier kan være nyttige ved vurdering af risikoen for alvorlige øjenskader/øjenirritation ved ukendte testkemikalier eller en ukendt produktgruppe eller ved vurdering af et klassificeret kemikalies potentielle relative øjenætsende toksicitet inden for et specifikt område af irritationsresponser.

DATA OG RAPPORTERING

Data

47. Data fra individuelle vævsgentagelser i en analyseserie (f.eks. OD-værdier/toparealer for MTT-formazan og beregnede data for procentvis vævslevedygtighed for testkemikaliet og kontrolstoffer samt forudsigelse fra den endelige RhCE-forsøgsmetode) rapporteres i tabelform for hvert testkemikalie, herunder om nødvendigt data fra gentagne test. Endvidere rapporteres den gennemsnitlige procentvise vævslevedygtighed og forskel i levedygtighed mellem to vævsgentagelser (hvis n = 2 vævsgentagelser) eller standardafvigelse (hvis n ≥ 3 vævsgentagelser) for hvert testkemikalie og kontrolstof. Alle observerede interferenser for et testkemikalie med målingen af MTT-formazan gennem direkte MTT-reduktion og/eller farvet interferens rapporteres for hvert testet kemikalie.

Testrapport

48. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

▼**M8**

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/-numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk tilstand, flygtighed, pH, LogP, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, *osv.*

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger

— kendetegnet så vidt muligt ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

— fysisk tilstand og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt.

Positive og negative kontrolstoffer

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-registreringsnummer/-numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk tilstand, flygtighed, molekylvægt, kemisk gruppe og yderligere fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen, i det omfang det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for eventuel anvendelse af en anden negativ kontrol end ultrarent H_2O eller Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS

— begrundelse for eventuel anvendelse af en anden positiv kontrol end rent methylacetat

— henvisning til tidligere positive og negative kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen.

— *RhCE-vævsmodel og anvendt protokol (eventuelt med begrundelse for valg)*

▼**M8**

Betingelser for forsøgsmetoden

— den anvendte RhCE-vævsmodel, herunder batchnummer

— bølgelængde og båndpas (hvis relevant) anvendt til kvantificering af MTT-formazan og måleudstyrets linearitetsinterval (f.eks. spektrofotometer)

— beskrivelse af den metode, der blev anvendt til kvantificering af MTT-formazan

— eventuelt beskrivelse af det anvendte HPLC/UPLC-spektrofotometrisystem

— komplet dokumentation for den anvendte RhCE-vævsmodel, herunder om dens ydeevne. Der skal bl.a. gives oplysning om:

i) kvalitetskontrol vedrørende levedygtighed (leverandør)

ii) levedygtighed under betingelserne for forsøgsmetoden (bruger)

iii) kvalitetskontrol vedrørende barrierefunktion

iv) morfologi (hvis tilgængelig)

v) reproducerbarhed og forudsigelsesevne

vi) anden kvalitetskontrol af RhCE-vævsmodellen, hvis tilgængelig

— reference til historiske data for RhCE-modellen. Der skal bl.a. gives oplysning om: om kvalitetskontroldataene kan accepteres, sammenlignet med data fra tidligere batcher

— erklæring om, at testfaciliteten har dokumenteret kompetence i anvendelsen af forsøgsmetoden før rutinemæssig anvendelse ved testning af kompetencekemikalier

Acceptkriterier for analyseserier og test

— positive og negative kontrolgennemsnitsværdier og acceptintervaller på grundlag af historiske data

— acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til positiv og negativ kontrol

— acceptabel variabilitet mellem vævsprøver til testkemikaliet.

Testprocedure

— detaljer om den anvendte testprocedure

— doser af det anvendte testkemikalie og anvendte kontrolstoffer

— varighed og temperatur for eksponering, nedsænkning efter eksponering og inkubationstid efter eksponering (hvor det er relevant)

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden

▼M8

— eventuel angivelse af kontroller anvendt til direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier

— antal vævsprøver anvendt pr. testkemikalie og kontrol (positiv kontrol, negativ kontrol, NSMTT, NSCliving og NSCkilled, hvis relevant)

Resultater

— angivelse i tabelform af data fra hvert enkelt testkemikalie og hvert enkelt kontrolstof til hver analyseserie (herunder gentagne forsøg, hvis det er relevant) og hver gentagen måling, herunder OD-værdier eller topareal for MTT-formazan, vævslevedygtighedsprocent, gennemsnitlig vævslevedygtighedsprocent, vævsprøveforskelle eller standardafvigelse og endelig forudsigelse

— eventuelle resultater af kontroller anvendt for direkte MTT-reduktionsmidler og/eller farvede testkemikalier, herunder OD-værdi eller topareal for MTT-formazan, % NSMTT, % NSCliving, % NSCkilled, forskelle mellem vævsprøver eller standardafvigelse, endelig korrekt vævslevedygtighedsprocent og endelig forudsigelse

— resultater opnået med testkemikaliet/-kemikalierne og kontrolstofferne i forhold til de fastlagte acceptkriterier for analyseserier og test

— beskrivelse af andre observerede virkninger, f.eks. farvning af væv på grund af et farvet testkemikalie.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Tilgængelig på: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.

(3) Kapitel B.47 i dette bilag, Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

(4) Kapitel B.48 i dette bilag, Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetode til identifikation af i) kemikalier, der fremkalder alvorlig øjenskade og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering.

(5) Kapitel B.61 i dette bilag, Fluoresceinudsivnings-forsøgsmetode til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer.

▼**M8**

(6) Kapitel B.68 i dette bilag, Forsøgsmetode med kortvarig eksponering in vitro til identifikation af i) kemikalier, der fremkalder alvorlige øjenskader, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlige øjenskader.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Tilgængelig på: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 DA doi: 10.2787/043697. Tilgængelig på: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Tilgængelig på: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuskript under udarbejdelse).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, s. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, s. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, s. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610–2 625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Tilgængelig på: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Tilgængelig på: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Tilgængelig på: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af "relevans". Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (18).

Referencekemikalie: et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et referencekemikalie skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder til identifikation og karakterisering heraf, ii) strukturel og funktionel lighed og/eller kemisk lighed eller lighed med hensyn til produktgruppe med de(t) kemikalie(r), der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Bottom-up-tilgang: trinvis tilgang til et testkemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering og mærkning for øjenirritation eller alvorlige øjenskader, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation og mærkning (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Konkordans: se "Nøjagtighed".

Cornea: den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

CV: variationskoefficient

Dev.: afvigelse.

EIT: øjenirritationstest.

EURL ECVAM: EU-referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg.

Øjenirritation: frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversible inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Reversible virkninger på øjet" og "UN GHS/CLP-kategori 2".

ET_{50}: den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte vævets levedygtighed med 50 % ved påføring af et referencekemikalie i en nærmere angivet fast koncentration.

Falsk negativ-rate: den andel af alle positive stoffer som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negativ. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative stoffer, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positiv. Det er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skadelige virkninger, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (humant cornea-epithel)

▼M8

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (højtryksvæskekromatografi)

IC_{50}: koncentration, hvor et referencekemikalie nedsætter vævets levedygtighed med 50 % efter en fast eksponeringstid (f.eks. 30 minutters behandling med SDS).

Ubegrænset dosis: den mængde testkemikalie, som er påført på RhCE-vævsmodellen ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epithelets overflade på en ensartet måde.

Irreversible virkninger på øjet: se "Alvorlige øjenskader".

LLOQ: Lower Limit of Quantification (laveste kvantitative bestemmelsesgrænse)

LogP: logaritmen af oktanol/vand-fordelingskoefficient

Blanding: blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: et stof, der defineres af sin mængdemæssige sammensætning, hvori flere end én hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved at blande to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid thiazolylblåt tetrazolium-bromid.

Negativ kontrol: en prøve, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som ikke vides at inducere en positiv respons i testsystemet. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller og anvendes til at bestemme 100 % vævslevedygtighed.

Ikke klassificeret: kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation (UN GHS/CLP-kategori 2, UN GHS-kategori 2A eller 2B) eller alvorlige øjenskader (UN GHS/CLP-kategori 1). Synonymt med "UN GHS/CLP – uden for kategori".

NSC_{killed}: ikke-specifik farve i dødt væv

NSC_{living}: ikke-specifik farve i levende væv

NSMTT: ikke-specifik MTT-reduktion.

OD: optisk tæthed.

Ydeevnestandarder: standarder, som med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode, der blev betragtet som videnskabeligt valid, danner grundlag for at vurdere, om en foreslået forsøgsmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De indeholder bl.a.: i) de centrale dele af forsøgsmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier udvalgt blandt de kemikalier, der benyttes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede forsøgsmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (18).

▼M8

Positiv kontrol: en prøve, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons i testsystemet. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (18).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (18).

Erstatningstest: test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier (18).

Reproducerbarhed: overensstemmelse mellem resultater af gentagne test af samme testkemikalie med samme testprotokol (jf. "Pålidelighed") (18).

Reversible virkninger på øjet: se "Øjenirritation".

RhCE: rekonstrueret humant cornea-lignende epithel

Analyseserie: en analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en negativ kontrol og en positiv kontrol.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Følsomhed: andelen af alle positive/aktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (18).

▼M8

Alvorlig øjenskade: frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Synonymt med "Irreversible virkninger på øjet" og "UN GHS/CLP-kategori 1".

Standardprocedurer (SOP): formelle skriftlige procedurer med detaljeret beskrivelse af, hvordan rutinemæssig og testspecifik laboratoriepraksis bør udføres. De er et krav i henhold til GLP.

Specificitet: andelen af alle negative/inaktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (18).

Stof: et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Test: et enkelt testkemikalie, der sideløbende testes i mindst to vævsprøver, som defineret i den tilsvarende standardprocedure.

Vævslevedygtighed: parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation i et rekonstrueret væv som deres evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT, og som, afhængigt af den effektparameter, der måles, og udformningen af testen, korrelerer med det samlede antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

Top-down-tilgang: trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlige øjenskader, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlige øjenskader (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Trindelt testningsstrategi: trindelt teststrategi, hvor der anvendes sekventielle forsøgsmetoder. Alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie gennemgås i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en "weight of evidence"-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til strategiens næste trin. Hvis et testkemikalies farepotentiale/styrke kan underbygges på et givet trin baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test (18).

ULOQ: Upper Limit of Quantification (øverste kvantitative bestemmelsesgrænse)

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (1).

UN GHS/CLP-kategori 1: se "Alvorlige øjenskader".

UN GHS/CLP-kategori 2: se "Øjenirritation".

UN GHS/ CLP – uden for kategori: kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller UN GHS-kategori 2A eller 2B). Synonymt med "Ikke-klassificeret".

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultra-højtryksvæskekromatografi)

▼**M8**

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: en forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men er kun gyldig i forbindelse med et bestemt formål (18).

Valideret forsøgsmetode: en forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (18).

VRM: Valideret referencemetode

VRM1: EpiOcular™ EIT omtales som valideret referencemetode 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT omtales som valideret referencemetode 2.

"Weight of evidence"-analyse: En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et testkemikalies farepotentiale.

▼M8

Tillæg 2

Vigtigste Komponenter i Rhce-Test Valideret til Identifikation af Kemikalier, som Ikke Kræver Klassificering og Mærkning for Øjenirritation Eller Alvorlige Øjenskader

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoller	Væsker (kan pipetteres ved 37 ± 1°C eller lavere temperaturer i 15 min.)	Faste stoffer (kan ikke pipetteres)	Væsker og viskøse stoffer (kan pipetteres)	Faste stoffer (kan ikke pipetteres)
Modelareal	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Antal vævsprøver	Mindst 2	Mindst 2	Mindst 2	Mindst 2
Forhåndskontrol for farve-interferens	50 µl + 1 ml H_2O i 60 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (ikke-farvede testkemikalier) eller 50 µl + 2 ml isopropanol blandet i 2-3 timer ved stuetemp. (farvede testkemikalier) →Hvis testkemikaliets OD ved 570 ± 20 nm efter fratrækning af OD for isopropanol eller vand er > 0,08 (som svarer til ca. 5 % af den gennemsnitlige OD for den negative kontrol), bør der foretages tilpassede "living" kontroller.	50 mg + 1 ml H_2O i 60 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (ikke-farvede testkemikalier) og/eller 50 mg + 2 ml isopropanol blandet i 2-3 timer ved stuetemp. (farvede og ikke-farvede testkemikalier) →Hvis testkemikaliets OD ved 570 ± 20 nm efter fratrækning af OD for isopropanol eller vand er > 0,08 (som svarer til ca. 5 % af den gennemsnitlige OD af den negative kontrol), bør der foretages tilpassede "living" kontroller.	10 µl + 90 µl H_2O blandet i 30 ± 2 min. ved stuetemp. (RT, 18-28°C) →Hvis testkemikaliet er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller	10 mg + 90 µl H_2O blandet i 30 ± 2 min. ved stuetemp. →Hvis testkemikaliet er farvet, bør der gennemføres tilpassede "living"-kontroller

▼M8

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Forhåndskontrol for direkte MTT-reduktion	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH →Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller (50 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % RH →Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "freeze-killed"-kontroller (50 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH →Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller (30 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml opløsning i 180 ± 15 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH →Hvis opløsningen bliver blå/violet, bør der gennemføres tilpassede "water-killed"-kontroller (30 µl sterilt afioniseret vand i MTT-opløsning bruges som negativ kontrol)
Forbehandling	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS i 30±2 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, beskyttet mod lys.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} -frit DPBS i 30±2 min. ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, beskyttet mod lys.	-	-
Behandlingsdoser og påføring	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) ved hjælp af et kalibreret værktøj (f.eks. en strøget skefuld, der er kalibreret, så den rummer 50 mg natriumchlorid).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Til viskøse stoffer benyttes et nylonnet	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Eksponeringstid og temperatur	30 min. (± 2 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 timer (± 0,25 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min. (± 2 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 timer (± 0,1 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥95 % RH
Skylning ved stuetemperatur	3 gange i 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS	3 gange i 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS
Nedsænkning efter eksponering	12 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium	25 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium	30 min (± 2 min.) ved 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH i dyrkningsmedium	30 min. (± 2 min.) ved stuetemp. i dyrkningsmedium

▼M8

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubation efter eksponering	120 min. (± 15 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 timer (± 0,25 min.) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	Ingen	18 timer (± 0,5 timer) i dyrkningsmedium ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Negativ kontrol	50 µl H_2O Testes samtidig	50 µl H_2O Testes samtidig	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS Testes samtidig	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-frit DPBS Testes samtidig
Positiv kontrol	50 µl methylacetat Testes samtidig	50 µl methylacetat Testes samtidig	30 ± 2 µl methylacetat Testes samtidig	30 ± 2 µl methylacetat Testes samtidig
MTT-opløsning	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubationstid og temperatur	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min. (± 15 min.) ved 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Ekstraktionsopløsnings-middel	2 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen ved at gennembore vævet)	2 ml isopropanol (ekstraktion fra bund af indsatsen ved at gennembore vævet)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra top og bund af indsatsen)	1,5 ml isopropanol (ekstraktion fra bund af indsatsen)
Ekstraktionstid og -tempe-ratur	2-3 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller natten over ved 4-10°C	2-3 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller natten over ved 4-10°C	4 timer under omrystning (~120 o/min.) ved stuetemp. eller mindst natten over uden omrystning ved 4-10°C	Mindst 2 timer under omryst-ning (~120 o/min.) ved stuetemp.
OD-aflæsning	570 nm (550-590 nm) uden referencefilter	570 nm (550-590 nm) uden referencefilter	570 nm (540-600 nm) uden referencefilter	570 nm (540-600 nm) uden referencefilter
Kvalitetskontrol af væv	Behandling med 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	Behandling med 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	behandling i 30 min. med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	behandling i 30 min. med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

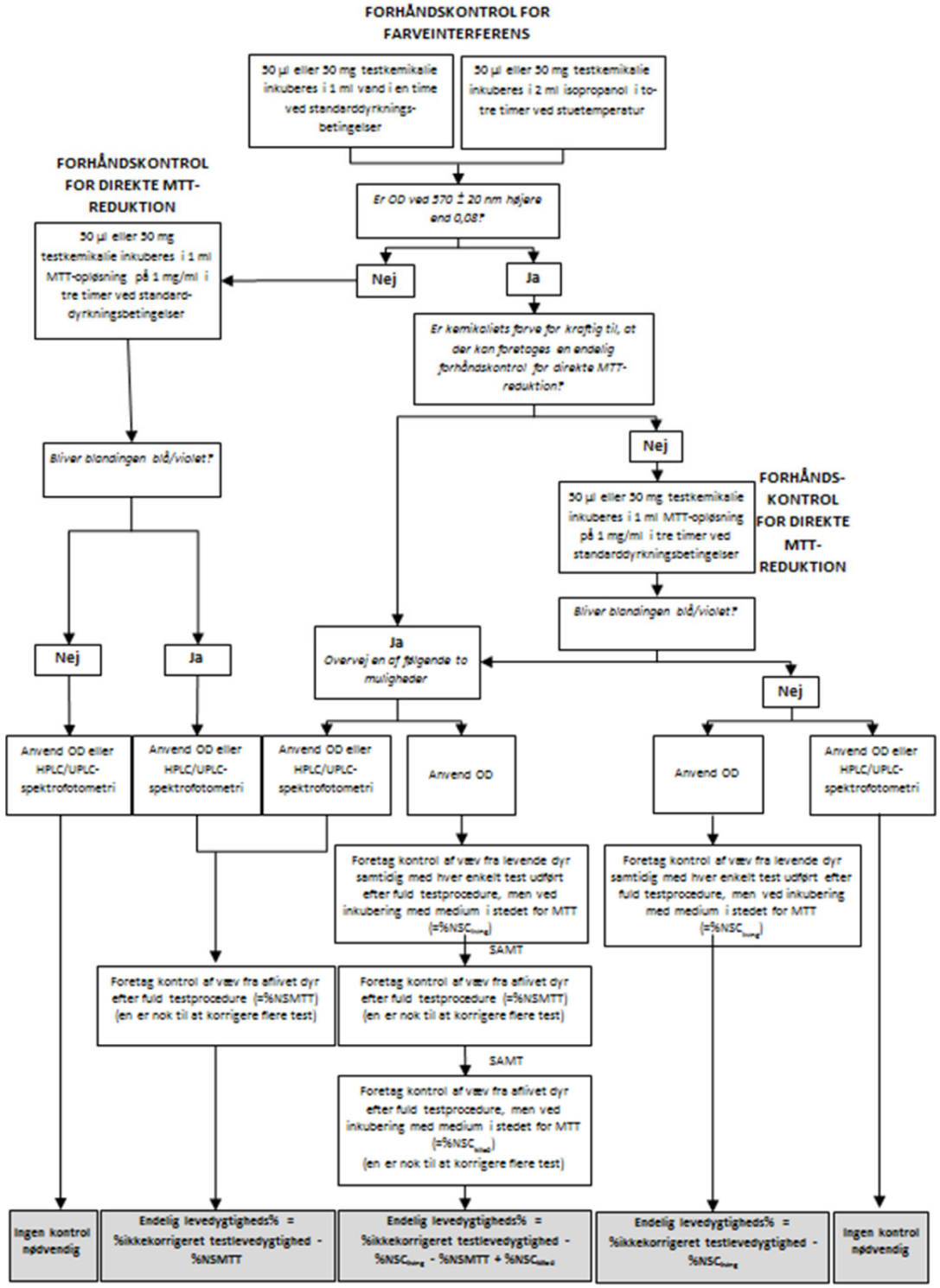
▼M8

Testkomponenter	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Acceptkriterier	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være > 0,8 og < 2,5. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 30 min. for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 50 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være > 0,8 og < 2,5. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 6 timer for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være < 50 % 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være > 1,0 og ≤ 2,5. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 30 min. for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 30 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.	1. Den gennemsnitlige OD for vævsprøver behandlet med negativt kontrolstof bør være > 1,0 og ≤ 2,5. 2. Den gennemsnitlige levedygtighed for vævsprøver eksponeret i 4 timer for positivt kontrolstof, udtrykt som % af den negative kontrol, bør være ≤ 20 %. 3. Forskellen i levedygtighed mellem to vævsprøver bør være under 20 %.

▼**M8**

Tillæg 3

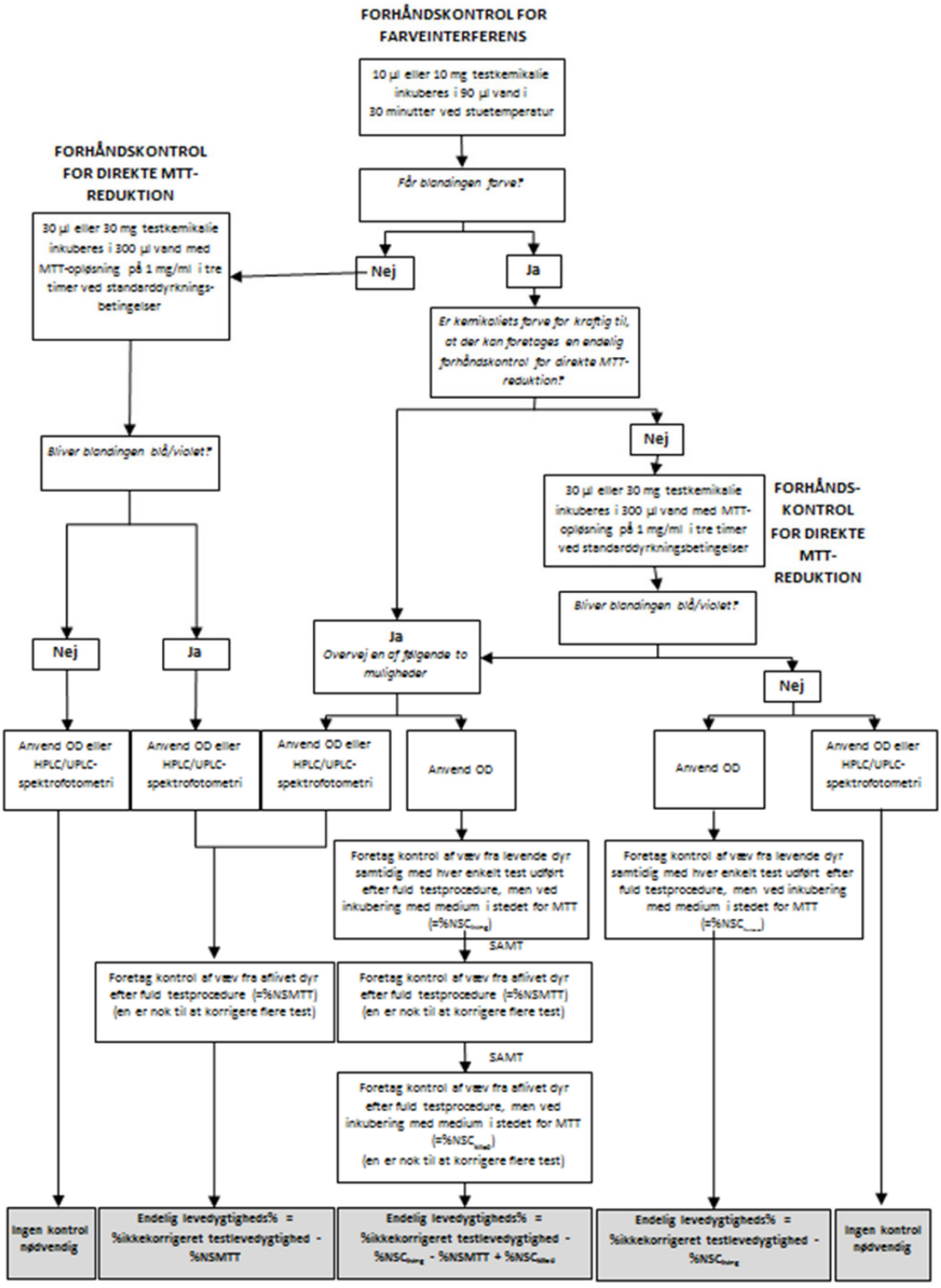
ILLUSTRATIVT FLOWDIAGRAM OVER RETNINGSLINJER FOR, HVORDAN MAN IDENTIFICERER OG HÅNDTERER DIREKTE MTT-REDUKTIONSMIDLER OG/ELLER FARVEINTERFERERENDE KEMIKALIER BASERET PÅ VRM1 SOP



▼**M8**

Tillæg 4

ILLUSTRATIVT FLOWDIAGRAM OVER RETNINGSLINJER FOR, HVORDAN MAN IDENTIFICERER OG HÅNDTERER DIREKTE MTT-REDUKTIONSMIDLER OG/ELLER FARVEINTERFERERENDE KEMIKALIER BASERET PÅ VRM2 SOP



▼**M8**

Tillæg 5

NØGLEPARAMETRE OG ACCEPTKRITERIER FOR KVALIFICERING AF ET HPLC/UPLC-SPEKTROFOTOMETRISYSTEM TIL MÅLING AF MTT-FORMAZAN EKSTRAHERET FRA RHCE-VÆVSMODELLER

Parameter	Protokol fra FDA-vejledning (36)(38)	Acceptkriterier
Selektivitet	Analyse af isopropanol, "living blank" (isopropanolekstrakt fra modeller af levende RhCE-væv uden behandling), "dead blank" (isopropanolekstrakt fra modeller af dødt RhCE-væv uden behandling) og et farvestof (f.eks. methylenblåt)	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$ ([1])
Præcision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan ved 1,6 µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) i isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Nøjagtighed	Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ
Matrixvirkning	Kvalitetskontrol i "living blank" (n=5)	85 % ≤ matrixvirkning i % ≤ 115 %
Overførsel	Analyse af isopropanol efter en ULOQ ([2]) standard	$Areal_{interferens} \leq 20$ % af $Areal_{LLOQ}$
Reproducerbarhed (inden for en dag)	Tre uafhængige kalibreringskurver (baseret på seks på hinanden følgende 1/3-opløsninger af MTT-formazan i isopropanol begyndende ved ULOQ, dvs. 200 µg/ml). Kvalitetskontroller i isopropanol (n=5)	Kalibreringskurver: %Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % for LLOQ Kvalitetskontroller: %Dev ≤ 15 % og CV ≤ 15 %
Reproducerbarhed (mellem flere dage)	Dag 1: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 2: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3) Dag 3: en kalibreringskurve og kvalitetskontroller i isopropanol (n=3)	
MTT-formazans kortsigtede stabilitet i RhCE-vævsekstrakt	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter 24 timers opbevaring ved stuetemperatur	%Dev ≤ 15 %
MTT-formazans langsigtede stabilitet i RhCE-vævsekstrakt (hvis påkrævet)	Kvalitetskontroller i "living blank" (n=3) analyseret på præpareringsdagen og efter flere dages opbevaring ved -20 °C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: nedre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den dækker 1-2 % vævslevedygtighed, dvs. 0,8 µg/ml.

([2]) ULOQ: øvre grænse for kvantitativ bestemmelse, defineret så den er mindst to gange så høj som den højeste forventede MTT-formazankoncentration i isopropanolekstrakter fra negative kontroller (~70 µg/ml i VRM), dvs. 200 µg/ml.

▼M8

B.70. *IN VITRO*-ASSAYS MED HUMAN REKOMBINANT ØSTROGENRECEPTOR (hrER) TIL PÅVISNING AF KEMIKALIER MED ER-AFFINITET

GENEREL INDLEDNING

OECD's ydeevnebaserede forsøgsretningslinje

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 493 (2015). TG 493 er en ydeevnebaseret forsøgsretningslinje (PBTG) med beskrivelse af metoden for i*n vitro* assays med human rekombinant østrogenreceptor til påvisning af stoffer med østrogenreceptor-affinitet (hrER-affinitetassays). Den omfatter to mekanistisk og funktionelt lignende assays til identifikation af østrogenreceptorbindere (dvs. ERα) og ventes at lette udvikingen af nye lignende eller modificerede assays i overensstemmelse med de principper for validering, som er fastsat i OECD's Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). De fuldt validerede referenceforsøgsmetoder (tillæg 2 og tillæg 3), som danner grundlag for denne PBTG, er:

— Freyberger-Wilson (FW) *In Vitro* Estrogen Receptor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ERα (2) og

— The Chemical Evaluation and Research Institute's (CERI) *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein (2).

Der findes ydeevnestandarder (PS) (3) for at lette udvikling og validering af lignende forsøgsmetoder til den samme fareegenskab og give mulighed for rettidig ændring af PBTG 493, så nye lignende assays kan føjes til en opdateret PBTG. Lignende testassays vil dog først blive tilføjet efter OECD's kontrol af og samtykke til, at ydeevnestandarderne er opfyldt. De assays, der er omfattet af TG 493, kan uden forskel anvendes til at opfylde OECD-medlemslandenes krav til forsøgsresultaterne om østrogenreceptor-affinitet, samtidig med at de drager fordel af OECD's gensidige anerkendelse af data.

Baggrund og principper for de assays, der indgår i denne forsøgsmetode

2. OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet om revision af eksisterende og udvikling af nye forsøgsretningslinjer til screening og test af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's begrebsramme for testning og vurdering af potentielle hormonforstyrrende kemikalier blev revideret i 2012. Den oprindelige og reviderede begrebsramme er vedlagt som bilag til det vejledende dokument, Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4). Begrebsrammen omfatter fem niveauer, idet hvert niveau svarer til forskellige niveauer af biologisk kompleksitet. De ER-affinitetsassays, som beskrives i denne forsøgsmetode, er niveau 2, der omfatter *»in vitro-assays, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje«*. Denne forsøgsmetode er til in vitro-receptoraffinitetsassays udformet til at identificere ligander for den humane østrogenreceptor alfa (ERα).

▼**M8**

3. Relevansen af in vitro-ER-affinitets-assayet for biologiske funktioner er tydeligt påvist. ER-affinitetsassays er udformet til at identificere kemikalier, som har potentiale til at forstyrre østrogenhormonvejen, og er i udstrakt grad blevet anvendt i den seneste snes år til at karakterisere ER-vævsfordeling samt til at identificere ER-agonister/-antagonister. Disse assays afspejler ligand-receptor-interaktionen, som er det indledende skridt på østrogensignaleringsvejen og er væsentlig for reproduktionsfunktionen hos alle hvirveldyr.

4. Østrogeners interaktion med ER'er kan påvirke transkription af østrogenkontrollerede gener og inducere ikke-genomiske virkninger, der kan føre til induktion eller inhibering af cellulære processer, herunder processer, som er nødvendige for celleproliferation, normal fosterudvikling og reproduktiv funktion (5)(6)(7). Forstyrrelse af normale østrogensystemer kan have potentiale til at udløse skadelige virkninger på normal udvikling (ontogenese), reproduktiv sundhed og det reproduktive systems integritet. Mangelfuld ER-signalering kan medføre virkninger som øget risiko for hormonbetinget cancer, forringet forplantningsevne og ændringer i fostervækst og -udvikling (8).

5. In vitro-affinitetsassays er baseret på direkte interaktion mellem et stof med et specifikt bindingssted for receptorliganden, som regulerer gentranskriptionen. Den vigtigste komponent for bindingsassayet vedrørende human rekombinant østrogenreceptor alfa (hrERα) måler en radioaktivt mærket ligands evne ([^{3}H]17β-østradiol) til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand og dokumentere ER-specificitet efterfulgt af et forsøg med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.

6. CERI's valideringsstudier og FW-bindingsassays har påvist deres relevans og pålidelighed i overensstemmelse med deres formål (2).

7. Definitioner og forkortelser brugt i denne forsøgsmetode er beskrevet i tillæg 1.

Anvendelsesområde og begrænsninger i forbindelse med receptorbindingsassays

8. Disse assays foreslås til screenings- og prioriteringsformål, men kan også give oplysninger til en molekylær initiering (MIE), som kan anvendes i en »weight of evidence«-analyse. De analyserer kemikaliets binding til ERα-ligandens bindingsområde i et in vitro-system. Således bør resultaterne ikke direkte ekstrapoleres til den komplekse signalering og regulering af det intakte hormonsystem in vivo.

▼**M8**

9. Binding af den naturlige ligand, 17β-østradiol, er det indledende skridt i en række molekylære begivenheder, der aktiverer transkriptionen af målgener og i sidste ende kulminerer med en fysiologisk forandring (9). Binding til ERα-ligandbindingsområdet betragtes som en af de centrale mekanismer ved ER-medieret hormonforstyrrelse (ED), skønt der findes andre mekanismer, gennem hvilke ED kan forekomme, bl.a. (i) interaktioner med andre ERα-steder end ligandbindingslommen, (ii) interaktioner med andre receptorer af relevans for østrogensignalering, ER-β og G-proteinkoblet østrogenreceptor, andre receptorer og enzymsystemer i hormonsystemet, (iii) hormonsyntese, (iv) metabolisk aktivering og/eller inaktivering af hormoner, (v) fordeling af hormoner til målvæv og (vi) udskilning af hormoner fra kroppen. Ingen af de assays, der er omfattet af denne forsøgsmetode, behandler disse virkemåder.

10. Denne forsøgsmetode behandler stoffers evne til at binde sig til humant ERα og skelner ikke mellem ERα-agonister og -antagonister. Disse assays behandler heller ikke yderligere downstream-begivenheder såsom gentranskription eller fysiologiske forandringer. I betragtning af at alene enkeltstoffer med kun én bestanddel blev anvendt under valideringen, er anvendeligheden på forsøgsblandinger ikke blevet behandlet. Assays kan dog teoretisk set benyttes til test af stoffer med forskellige bestanddele og blandinger. Før forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding for at generere data til lovmæssige formål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

11. De cellefrie receptorsystemer har ingen iboende metabolisk kapacitet, og de blev ikke valideret i kombination med metaboliske enzymsystemer. Det kunne dog være muligt at indarbejde metabolisk aktivitet i forsøgsdesignet, men dette ville kræve en yderligere valideringsindsats.

12. Kemikalier, der kan denaturere proteinet (dvs. receptorprotein), såsom overfladeaktivt stof eller kemikalier, der kan ændre assaybufferens pH-værdi, kan ikke testes eller kan kun testes ved koncentrationer uden sådanne interaktioner. Ellers er det koncentrationsområde, som kan testes i assays for et testkemikalie, begrænset ved sin opløselighed i assaybufferen.

13. Til orientering viser tabel 1 testresultaterne for de 24 stoffer, som blev testet i begge de fuldt validerede assays, der beskrives i denne forsøgsmetode. Af disse stoffer er 17 klassificeret som ER-bindere og 6 som ikke-bindere baseret på offentliggjorte rapporter, herunder in vitro-assays for ER-transkriptionsaktivering og/eller det uterotrofiske assay (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). I henhold til de data, der er opsummeret i tabel 1, var der næsten 100 % overensstemmelse mellem de to assays om klassificeringer af alle stoffer op til 10^{-4}M, og hvert stof blev korrekt klassificeret som en ER-binder eller ikke-binder. Supplerende information om denne gruppe af stoffer samt supplerende stoffer, som er testet i ER-bindingsassays i løbet af valideringsundersøgelserne, er anført i ydeevnestandarderne for hrER-bindingsassayet (3), tillæg 2 (tabel 1, 2 og 3).

▼M8

Tabel 1

Klassificering af stoffer som ER-bindere eller ikke-bindere ved testning i FW- og CERI-hrER-bindingsassays med sammenligning med forventet respons

	Stof	CAS RN	Forventet respons	FW-assay		CERI-assay		MESH-kemikalie: Gruppe	Produktgruppe
				Koncentrations-område (M)	Klassificering	Koncentrations-område (M)	Klassificering		
1	17β-østradiol	50-28-2	*Binder*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
2	Norethynodrel	68-23-5	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
3	Norethindron	68-22-4	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
4	Di-*n*-butylphthalat	84-74-2	*Ikke-binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder (**) (+)	Kulbrinte (cyklisk), ester	Blødgører, kemisk mellemprodukt
5	DES	56-53-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
6	17α-ethynyløstradiol	57-63-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
7	Meso-hexestrol	84-16-2	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
8	Genistein	446-72-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinte (heterocyklisk), flavonoid	Naturprodukt

▼M8

	Stof	CAS RN	Forventet respons	FW-assay		CERI-assay		MESH-kemikalie: Gruppe	Produktgruppe
				Koncentrations-område (M)	Klassificering	Koncentrations-område (M)	Klassificering		
9	Equol	531-95-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phytoøstrogenmetabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (*n* butyl-4-hydroxyben-zoat)	94-26-8	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Paraben	Konserveringsmiddel
11	Nonylphenol (blan-ding)	84852-15-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylphenol	Mellemprodukt
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Organiske chlorforbin-delser	Insekticid
13	Corticosteron	50-22-6	*Ikke-binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinte (heterocy-klisk), lacton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt, veterinær
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroid, ikke-phenolisk	Naturprodukt
17	Bisphenol A	80-05-7	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phenol	Kemisk mellemprodukt
18	4-*n*-heptylphenol	1987-50-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Usikker [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylphenol	Mellemprodukt

▼M8

	Stof	CAS RN	Forventet respons	FW-assay		CERI-assay		MESH-kemikalie: Gruppe	Produktgruppe
				Koncentrations-område (M)	Klassificering	Koncentrations-område (M)	Klassificering		
19	Kepon (chlordecon)	143-50-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Kulbrinter (halogene-rede)	Pesticid
20	Benz(a)anthracen	56-55-3	*Ikke-binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ikke-binder ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ikke-binder ([b])	Aromatiske kulbrinter	Mellemprodukt
21	Enterolacton	78473-71-9	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Phytoøstrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	*Ikke-binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	Steroid	Naturprodukt
23	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	*Ikke-binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ikke-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ikke-binder	Silan	Overflademodifikator
24	Atrazin	1912-24-9	*Ikke-binder* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Ikke-binder	heterocyklisk forbin-delse	Herbicid

(*) Opløselighedsgrænse < 1×10^{-4}M.

(**) Anvendelsen og klassificeringen af di-n-butylphthalat (DBP) som ikke-binder var baseret på testning op til 10^{-4} M, fordi det i nogle laboratorier under prævalideringsundersøgelserne var observeret, at stoffet var uopløseligt ved 10^{-3}M (f.eks. turbiditet).

(+) Under valideringsundersøgelsen blev di-*n*-butylphthalat (DBP) testet som et kodet teststof ved koncentrationer op til 10^{-3}M. Under disse betingelser observerede nogle laboratorier enten et fald i radioligandbinding ved den højeste koncentration (10^{-3}M) og/eller en flertydig kurvetilpasning. For disse analyseserier blev DBP klassificeret som »usikker« eller »binder« i 3 ud af 5 laboratorier, som benyttede CERI-assayet, og 5 ud af 6 laboratorier, der benyttede FW-assayet (jf. henvisning (2), afsnit IV.B.3a,b og VI.A).

([a]) Klassificeringen var ikke i overensstemmelse med den forventede klassificering. Klassificeringen af 4-*n*-heptylphenol som »usikker« eller »ikke-binder« af 3 ud af 5 laboratorier resulterede i en gennemsnitlig klassificering som usikker. En nøjere kontrol afslørede, at dette skyldtes begrænsninger i kemikalieopløseligheden, som forhindrede beregningen af en fuld bindingskurve.

([b]) I løbet af valideringsundersøgelsen blev benz(a)anthracen omklassificeret som en ikke-binder (dvs. negativt) på grundlag af offentliggjort litteratur, som påviste, at in vitro-østrogenaktivitet rapporteret for dette stof (16) primært afhænger af dets metaboliske aktivering (17)(18). Enzymmetabolisk aktivering af stoffet ville ikke forventes i de cellefrie hrER-bindingsassays, som de anvendes i denne valideringsundersøgelse med deltagelse af flere laboratorier. Således er den korrekte klassificering for dette stof en »ikke-binder«, når det anvendes under forsøgsbetingelser til FW- og CERI-assays.

▼M8

KOMPONENTER I hrER-BINDINGSASSAY

De centrale dele af assayets komponenter

14. Denne forsøgsmetode gælder for assays, der anvender en ER-receptor og en passende stærk ligand til receptoren, der kan bruges som markør/sporstof for assayet og kan fortrænges med stigende koncentrationer af et testkemikalie. Bindingsassays indeholder følgende to hovedkomponenter: 1) mætningsbinding og 2) kompetitiv binding. Mætningsbindingsassayet benyttes til at bekræfte receptorpræparaternes specificitet og aktivitet, mens det kompetitive bindingsforsøg benyttes til at vurdere et testkemikalies evne til at binde sig til hrER.

Kontroller

15. Grundlaget for forslaget til sideløbende referenceøstrogen og kontroller bør beskrives. Sideløbende kontroller (opløsningsmiddel (bærestof), positiv (ER-binder, stærk og svag affinitet), negativ (ikke-binder)), hvor det er relevant, viser, at assayet virker under testbetingelser og danner grundlag for sammenligninger af forsøg. De indgår normalt i acceptkriterierne for et givet forsøg (1). Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle andre plader skal indeholde: 1) en høj (næsten fuld fortrængning af radioaktivt mærket ligand) og middelhøj (næsten IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder, hver især in triplo 2) en kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især in triplo.

Procedurer for standardkvalitetskontrol

16. Procedurer for standardkvalitetskontrol udføres som beskrevet for hvert assay for at sikre aktive receptorer og korrekte kemiske koncentrationer, og at tolerancegrænser forbliver stabile gennem mange replikationer og bevarer evnen til at give de forventede ER-bindingsresponser over tid.

Påvisning af laboratoriets kompetence

17. Inden ukendte kemikalier testes med et af de assays, der indgår i denne forsøgsmetode, skal det enkelte laboratorium påvise kompetence til at bruge assayet ved at udføre mætningsassays til at bekræfte ER-præparatets specificitet og aktivitet og kompetitive bindingsassays med referenceøstrogen og kontroller (svag binder og ikke-binder). Laboratoriet skal oprette en historisk database med resultater for referenceøstrogenet og de kontroller, der er genereret fra 3-5 uafhængige forsøg gennemført på forskellige dage. Disse forsøg skal danne grundlaget for referenceøstrogenet og de historiske kontroller for laboratoriet og vil blive anvendt til en delvis vurdering af, om assayet kan godkendes til fremtidige analyseserier.

18. Testsystemets responsivitet vil også blive bekræftet ved at teste de kompetencestoffer, som er anført i tabel 2. Listen over kompetencestoffer er en del af de referencestoffer, der er anført i Performance Standards for the ER binding assays (3). Disse stoffer kan fås i handelen, repræsenterer kemikaliegrupper, der i almindelighed er forbundet med ER-bindingsaktivitet, og udviser et passende styrkeområde, som forventes for ER-bindere (dvs. stærk til svag) og ikke-bindere (dvs. negative). For hvert kompetencestof skal de testede koncentrationer dække det område, der er anført i tabel 2. Der udføres mindst tre forsøg for hvert stof, og resultaterne skal være i overensstemmelse med den forventede kemiske aktivitet. Hvert forsøg gennemføres uafhængigt (dvs. med friske receptorfortyndinger, kemikalier og reagens) med tre replikater for hver koncentration. Kompetence påvises ved korrekt klassificering (positiv/negativ) af hvert kompetencestof. Kompetencetest udføres af hver enkelt tekniker, når han/hun lærer et assay.

▼M8

Tabel 2

Liste over kontroller og kompetencestoffer for kompetitive hrER-bindingsassays ([1])

Nr.	Stof	CAS RN ([2])	Forventet respons ([3]) ([4])	Testkoncentrationsområde (M)	MeSH-kemikaliegruppe ([5])	Produktgruppe ([6])
Kontroller (referenceøstrogen, svag binder, ikke-binder)						
1	17ß-østradiol (E2)	50-28-2	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
2	Norethynodrel (eller) Norethindron	68-23-5 (eller) 68-22-4	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
3	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Ikke-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Overflademodifikator
Kompetencestoffer ([6])						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
5	17α-ethynyløstradiol	57-63-6	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutisk produkt, veterinær
6	Meso-hexestrol	84-16-2	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kulbrinte (cyklisk), phenol	Farmaceutisk produkt, veterinær
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kulbrinte (cyklisk)	Farmaceutisk produkt, veterinær
8	Genistein	446-72-0	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterocyklisk forbindelse, flavonoid	Naturprodukt
9	Bisphenol A	80-05-7	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Phenol	Kemisk mellemprodukt
10	Zearalonon	17924-92-4	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterocyklisk forbindelse, lacton	Naturprodukt

▼M8

Nr.	Stof	CAS RN ([2])	Forventet respons ([3]) ([4])	Testkoncentrationsområde (M)	MeSH-kemikaliegruppe ([5])	Produktgruppe ([6])
11	Butylparaben	94-26-8	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Carboxylsyre, phenol	Konserveringsmiddel
12	Atrazin	1912-24-9	Ikke-binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	heterocyklisk forbindelse	Herbicid
13	Di-n-butylphthalat (DBP) ([7])	84-74-2	Ikke-binder ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kulbrinte (cyklisk), ester	Blødgører, kemisk mellemprodukt
14	Corticosteron	50-22-6	Ikke-binder	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroid	Naturprodukt

([1]) Hvis et kompetencestof ikke længere kan fås i handelen, kan der anvendes et stof med samme ER-bindingsklassificering, sammenlignelig styrke og kemiske sammensætning.
([2]) Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service.
([3]) Klassificering som en ERα-binder eller ikke-binder i løbet af valideringsundersøgelsen for CERI- og FW-hrER-bindingsassays (2).
([4]) ER-bindingsaktivitet var baseret på ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER-bindings- og TA-assays (9) samt empiriske data og andre oplysninger fra omtalte undersøgelser, der er offentliggjort og bedømt (10)(11)(12)(13)(14)(15).
([5]) Stoffer blev fordelt i en eller flere kemikaliegrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), en internationalt anerkendt standardiseret klassificeringsordning (tilgængelig på: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Stoffer blev fordelt i en eller flere produktgrupper ved hjælp af det amerikanske National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (tilgængelig på: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
([7]) DBP kan anvendes som en alternativ kontrol-ikke-binder testet med en maksimal koncentration på 10^{-4} M.
([8]) Opløselighedsgrænsen for dette stof er 10^{-4} M. Anvendelsen og klassificeringen af di-n-butylphthalat (DBP) som ikke-binder var baseret på testning op til 10^{-4} M, fordi det var observeret, at stoffet var uopløseligt ved 10^{-3}M (f.eks. turbiditet) i nogle laboratorier under prævalideringsundersøgelserne.

▼M8

Opløselighedstest og bestemmelse af dosisinterval for testkemikalier

19. Der udføres en foreløbig test for at bestemme opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og yderligere bekræftes under assaybetingelser. De endelige koncentrationer, der testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Test af områdebestemmelsen består af en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med otte log-seriefortyndinger, der begynder ved den maksimalt acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald. Koncentrationer i det andet og tredje forsøg bør tilpasses, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentrationsresponskurven.

Acceptkriterier for testanalyseserien

20. Godkendelse eller forkastelse af en analyseserie er baseret på vurdering af de resultater, der er opnået for referenceøstrogen og den kontrol, der er anvendt til hvert enkelt forsøg. For det første skal de fuldstændige koncentrationskurver for referencekontrollerne fra hvert forsøg for plade 1 opfylde resultatmålingsmetoderne med parametrene for kurvetilpasningen (f.eks. IC_{50} og Hills kurve) baseret på de resultater, der er rapporteret for de respektive protokoller for CERI- og FW-assayene (tillæg 2 og 3) og de historiske kontroldata fra det laboratorium, der udfører testen. Alle kontroller (referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) skal være klassificeret korrekt for hvert forsøg. For det andet skal kontrollerne på alle efterfølgende plader vurderes for overensstemmelse med plade 1. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliet for klart at definere toppen af den kompetitive bindingskurve. Variabilitet mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliet samt mellem de tre uafhængige analyseserier skal være rimelige og videnskabeligt forsvarlige. Evnen til at gennemføre assayet konsistent skal påvises ved udvikling og vedligeholdelse af en historisk database for referenceøstrogenet og kontrollerne. Standardafvigelser eller variationskoefficienter (CV) for gennemsnit af kurver for referenceøstrogen og svage bindere, der fungerer som kontrol, og som lever op til parametrene fra flere forsøg, kan anvendes som et mål for reproducerbarhed i laboratorier. Der bør anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af pladekontrolresultaterne fra hver analyseserie samt for hvert testkemikalie.

Endvidere skal følgende principper for acceptkriterier overholdes:

— Der skal være tilstrækkelige data til en kvantitativ vurdering af ER-binding.

— De testede koncentrationer skal forblive inden for testkemikaliets opløselighedsområde.

Analyse af data

21. Den definerede fremgangsmåde ved analyse af data om mætning og kompetitiv binding skal overholde de centrale principper for karakterisering af interaktioner mellem receptor og ligand. Mæthedsbindingsdata analyseres normalt under anvendelse af en ikke-lineær regressionsmodel, der tager højde for samlet og ikke-specifik binding. En korrektion for ligandnedbrydning (f.eks. Swillens, 1995 (19)) kan være nødvendig ved bestemmelse af Bmax og Kd. Data fra kompetitive bindingsassays omdannes normalt (f.eks. procentvis specifik binding og testkemikaliekoncentration (log M)). Skøn

▼M8

over log (IC_{50}) for hvert testkemikalie bør bestemmes ved anvendelse af passende ikke-lineært kurvetilpasningssoftware, så det passer til en Hill-ligning med fire parametre. Efter en indledende analyse bør der foretages en gennemgang af kurvetilpasningsparametrene og en visuel gennemgang af, hvor godt bindingsdataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve. I nogle tilfælde kan det være nødvendigt at foretage en supplerende analyse for at få den bedste kurvetilpasning (f.eks. begrænsning af top og/eller bund af kurven, anvendelse af 10 %-reglen, jf. tillæg 4 og henvisning 2 (afsnit III.A.2).

22. Hvis acceptkriterierne opfyldes (punkt 20), er det tegn på, at assaysystemet fungerer korrekt, men det er ingen garanti for, at enhver test vil producere nøjagtige data. Kan de korrekte resultater af den første test gentages, er det bedste tegn på, at der blev produceret nøjagtige data.

Generelle kriterier for datafortolkning

23. Der er i øjeblikket ingen universelt anerkendt metode for fortolkning af ER-bindingsdata. Både kvalitative (f.eks. binder/ikke-binder) og/eller kvantitative (f.eks. log IC_{50}, relativ affinitet (RBA) osv.) vurderinger af hrER-medieret aktivitet bør være baseret på empiriske data og en solid videnskabelig vurdering.

Testrapport

24. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Assay:

— det anvendte assay

Kontrol/reference/testkemikalie

— oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger

— testkemikaliets stabilitet, hvis denne er kendt

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt

— måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som testkemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber

▼**M8**

Opløsningsmiddel/bærestof:

— karakterisering (art, leverandør og batch)

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

Receptorer:

— receptorkilde (leverandør, katalognr., parti, receptorart, aktiv receptorkoncentration fra leverandøren, certificering fra leverandøren)

— karakterisering af receptorer (herunder mætningsbindingsresultater): Kd, Bmax

— opbevaring af receptorer

— radioaktivt mærket ligand:

— leverandør, katalognr., parti, specifik aktivitet

Testbetingelser:

— begrænsninger for opløselighed under assaybetingelser

— sammensætning af bindingsbuffer

— receptorkoncentration

— sporstofkoncentration (dvs. radioaktivt mærket ligand)

— testkemikaliekoncentrationer

— procent bærestof i det endelige assay

— inkubationstemperatur og -periode

— metode for bunden/fri separation

— positive og negative kontrol-/referencestoffer

— kriterier for bedømmelse af test som positive, negative eller usikre

Testgodkendelse:

— faktiske IC_{50}-værdier og værdier for Hills kurve for sideløbende positive kontrol-/referencestoffer

Resultater:

— primære og bundne/frie data

— bekræftelseskontrol af denaturering, hvis det er relevant

— den laveste effektive koncentration (LEC), hvis den foreligger

— RBA og/eller IC_{50}-værdier, hvis det er relevant

— koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser sammen med en måling af fejl og konfidens (f.eks. SEM (middelfejlen på middeltallet), standardafvigelse, CV eller 95 % CI) og en beskrivelse af, hvordan disse værdier blev opnået

▼**M8**

Diskussion af resultater:

— anvendelse af 10 %-reglen

Konklusion

LITTERATUR

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): s. 1073-89.

(7) Younes M. og Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): s. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼M8

Tillæg 1

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

10 %-regel: mulighed for at se bort fra datapunkter i analyser, hvor gennemsnittet af replikater for det procentvise specifikt bundne [^{3}H]17β-østradiol ligger på 10 % eller mere over den, som blev observeret for gennemsnitsværdien ved en lavere koncentration (jf. tillæg 4).

Acceptkriterier: minimumsstandarder for udførelse af forsøgskontroller og referencestandarder. Alle acceptkriterier skal være opfyldt, for at et forsøg kan betragtes som gyldigt.

Nøjagtighed (konkordans): overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som assayet fører til (1).

CF: OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier).

Kemikalie: et stof eller en blanding

CV: Coefficient of variation (variationskoefficient)

E2: 17β-østradiol

ED: hormonforstyrrende virkning

hERα: human østrogenreceptor alfa

ER: østrogenreceptor

Østrogenaktivitet: et kemikalies evne til at efterligne 17β-østradiol med hensyn til dettes evne til at binde sig til østrogenreceptorer Binding til hERα kan påvises med denne forsøgsmetode.

IC 50: halvdelen af den maksimale effektive koncentration af et inhiberende testkemikalie

ICCVAM: US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme stoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad et assay kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (1).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved at anvende en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også "intern reproducerbarhed" (1).

LEC: laveste effektive koncentration er den laveste koncentration af testkemikaliet, som giver en respons (*dvs.* den laveste testkemikaliekoncentration, ved hvilken foldinduktionen er statistisk forskellig fra den sideløbende bærestofkontrol).

Me-too test: populært udtryk for et assay, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referenceforsøgsmetode. Benyttes som synonym for lignende forsøgsmetoder

▼M8

PBTG: ydeevnebaseret forsøgsretningslinje

Ydeevnestandarder: standarder, der med udgangspunkt i en valideret forsøgsmetode danner grundlag for at vurdere, om et foreslået assay, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenligneligt. De indeholder (1) de centrale dele af assayet, (2) en minimumsliste over referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der anvendes til at påvise, at den validerede forsøgsmetodes ydeevne er acceptabel, og (3) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede forsøgsmetode, og som det skal påvises, at det foreslåede assay kan yde ved vurdering ud fra minimumslisten over referencekemikalier (1).

Kompetencestoffer: en delmængde af referencestoffer, der indgår i ydeevnestandarderne, og som laboratorier kan anvende til at påvise teknisk kompetence med et standardiseret assay. Udvælgelseskriterier for disse stoffer omfatter typisk, at de repræsenterer responsområdet, fås i handelen, og at der foreligger referencedata af høj kvalitet.

Kompetence: dokumenteret evne til at gennemføre et assay korrekt, før ukendte stoffer testes.

Referenceøstrogen: 17ß-østradiol (E2, CAS 50-28-2)

Referenceforsøgsmetoder: de assays, hvorpå PBTG 493 er baseret

RBA: Relativ affinitet. RBA af et stof beregnes som en procentdel af logaritmen (IC_{50}) til stoffet i forhold til logaritmen (IC_{50}) af 17β-østradiol.

Relevans: beskrivelse af sammenhængen mellem et assay og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang assayet måler eller forudsiger den relevante biologiske virkning korrekt. Assayets nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dets relevans (1).

Pålidelighed: mål for, i hvilken grad et assay kan reproduceres i og mellem laboratorier over en længere periode, når det udføres efter samme protokol. Det bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier.

Standardafvigelse: standardafvigelse

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

Valideret forsøgsmetode: et assay, for hvilket der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har en tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (1).

Validering: den proces, hvorved pålideligheden og relevansen af en bestemt tilgang, metode, proces eller vurdering eller et bestemt assay fastslås til et defineret formål (1).

▼**M8**

Tillæg 2

FREYBERGER-WILSONS IN VITRO-ASSAYS VEDRØRENDE ØSTROGENRECEPTORMÆTNING (ERA) OG KOMPETITIV BINDING VED ANVENDELSE AF REKOMBINANT ERA I FULD LÆNGDE

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette in vitro-assay vedrørende østrogenreceptormætning (ERα) og kompetitiv binding anvender human receptor ERα(hrERα) i fuld længde, som produceres i og isoleres fra baculovirusinficerede insektceller. Protokollen, som blev udviklet af Freyberger og Wilson, gennemgik en international valideringsundersøgelse i flere laboratorier (2), der har påvist dens relevans og pålidelighed til assayets tilsigtede formål.

2. Dette assay er en screeningsprocedure til påvisning af stoffer, som kan binde sig til hrERα i fuld længde. Det benyttes til at bestemme et testkemikalies evne til at konkurrere med 17β-østradiol om binding til hrERα. Kvantitative assayresultater kan omfatte IC_{50} (et mål for den koncentration af testkemikaliet, der er nødvendig for at fortrænge halvdelen af [^{3}H]-17β-østradiol fra hrERα), og testkemikaliernes relative affiniteter for hrERα sammenlignet med 17β-østradiol. Til kemikaliescreeningsformål kan acceptable kvalitative assayresultater omfatte klassificeringer af testkemikalier som enten hrERα-bindere, ikke-bindere eller usikre baseret på kriterier beskrevet for bindingskurver.

3. Assayet anvender en radioaktivt mærket ligand, som kræver, at laboratoriet har licens til radioaktive materialer. Alle procedurer med radioisotoper og farlige kemikalier skal følge forskrifter og procedurer som beskrevet i national lovgivning.

4. Afsnittene "**GENEREL INDLEDNING**" og "**hrER-BINDINGS-ASSAYETS KOMPONENTER**" skal læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIPPER FOR ASSAYET (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. hrERα-bindingsassayet måler en radioaktivt mærket ligands ([3H]17β-østradiol) evne til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren.

6. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand efterfulgt af et forsøg med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.

7. Formålet med mætningsbindingsforsøget er at karakterisere en særlig batch af receptorer for affinitet og antal i forberedelsen af det kompetitive bindingsforsøg. Mætningsbindingsforsøget måler, under ligevægtsbetingelser, en fast østrogenreceptorkoncentrations affinitet for dens naturlige ligand (repræsenteret ved dissociationskonstanten, Kd) og koncentrationen af aktive receptorsteder (Bmax).

▼M8

8. Det kompetitive bindingsforsøg måler et stofs affinitet til at konkurrere med [3H]17β-østradiol om binding til ER. Affiniteten kvantificeres af koncentrationen af testkemikaliet, som under ligevægtsbetingelser, inhiberer 50 % af den specifikke binding af [3H]17β-østradiol (kaldet den "inhiberende koncentration på 50 %" eller IC50). Denne kan også vurderes ved hjælp af den relative affinitet (RBA, i forhold til IC50 for østradiol målt separat i den samme analyseserie). Det kompetitive bindingsforsøg måler bindingen af [3H]17β-østradiol ved en fast koncentration under tilstedeværelse af en bred vifte (otte størrelsesordener) af testkemikaliekoncentrationer. Dataene tilpasses herefter, hvor det er muligt, så de danner Hill-ligningen (Hill, 1910), der beskriver en kompetitiv binders fortrængning af den radioaktive ligand ét sted. Omfanget af fortrængningen af det radioaktivt mærkede østradiol ved ligevægt anvendes til at karakterisere testkemikaliet som en binder, ikke-binder eller som et kemikalie, der genererer en usikker respons.

FREMGANGSMÅDE

Påvisning af acceptabel ydeevne for hrERα-protein

9. Før der rutinemæssigt udføres mætningsassays og kompetitive bindingsassays, skal det påvises, at hver ny batch hrERα fungerer korrekt i det laboratorium, hvor det vil blive anvendt. Ydeevnen påvises gennem en totrinsproces. Det drejer sig om følgende trin:

— Der udføres et [^{3}H]-17β-østradiol-bindingsassay for at påvise hrERα-specificitet og mætning. Ikke-lineær regressionsanalyse af disse data (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og det efterfølgende Scatchard-plot bør dokumentere hrERα-affiniteten for [^{3}H]-17β-østradiol (Kd) og antallet af receptorer (Bmax) for hver batch hrERα.

— Der udføres et kompetitivt bindingsassay ved anvendelse af kontrolstofferne (referenceøstrogen (17β-østradiol)), en svag binder (f.eks. norethynodrel eller norethindron) og en ikke-binder (octyltriethoxysilan, OTES). Hvert laboratorium bør oprette en historisk database for at dokumentere konsistensen af IC_{50} og andre relevante værdier for referenceøstrogenet og den svage binder blandt forsøg og forskellige batcher af hrERα. Parametrene for de kompetitive bindingskurver for kontrolstofferne bør ligge inden for de grænser for konfidensintervallet på 95 % (jf. tabel 1), der blev udviklet ved hjælp af data fra laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen for dette assay (2).

Tabel 1

Ydeevnekriterier udviklet for referenceøstrogen og svage bindere, FW-hrER bindingsassay

Stof	Parameter	Gennemsnit [a]	Standardafvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller [b]	
				Nedre grænse	Øvre grænse
17β-østradiol	Top (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Bund (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hills kurve	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Stof	Parameter	Gennemsnit [a]	Standardafvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller [b]	
				Nedre grænse	Øvre grænse
Norethynodrel	Top (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Bund (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hills kurve	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindron [c]	Top (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Bund (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hills kurve	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Gennemsnit (n) ± standardafvigelse blev beregnet ved hjælp af skøn over kurvetilpassede parametre (Hill-ligning med fire parametre) til kontrolanalyseserier udført i fire laboratorier under valideringsundersøgelsen (jf. bilag N i reference 2).
[b] Konfidensintervallerne på 95 % anføres som en rettesnor for acceptkriterier.
[c] Testning af norethindron var valgfri for delopgave 4 under valideringsundersøgelsen (jf. reference 2, jf. delopgave 4). Således blev gennemsnittet ± standardafvigelse (n) beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) for kontrolanalyseserier udført i to laboratorier.
Intervallet for IC_{50} *vil afhænge af Kd af receptorpræparatet og koncentrationen af den radioaktivt mærkede ligand, som anvendes i det enkelte laboratorium. En passende justering af* IC_{50} *-intervallet baseret på betingelserne for udførelse af assayet vil være acceptabel.*

Påvisning af laboratoriets kompetence

10. Jf. punkt 17 og 18 og tabel 2 i afsnittet "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode. Hvert assay (mætning og kompetitiv binding) bør bestå af tre uafhængige analyseserier (dvs. friske fortyndinger af receptor, kemikalier og reagenser) på forskellige dage, og hver analyseserie bør indeholde tre replikater.

Bestemmelse af receptor(hrERα)koncentration

11. Den aktive receptorkoncentration varierer lidt efter batch og opbevaringsforhold. Af denne grund bør den koncentration af aktiv receptor, der modtages fra leverandøren, bestemmes. Dette vil give den rette koncentration af aktiv receptor på tidspunktet for analyseserien.

12. Under forhold svarende til kompetitiv binding (dvs. 1 nM [^{3}H]-østradiol) bør nominelle koncentrationer på 0,25, 0,5, 0,75 og 1 nM receptor inkuberes i fravær af (total binding) og under tilstedeværelse (ikke-specifik binding) af 1 μM umærket østradiol. Specifik binding beregnet som forskellen mellem total og ikke-specifik binding afsættes i forhold til den nominelle receptorkoncentration. Den receptorkoncentration, som giver specifikke bindingsværdier svarende til 20 % af de tilsatte radioaktivt mærkede stoffer, hænger sammen med den tilsvarende nominelle receptorkoncentration, og denne receptorkoncentration anvendes til mætningsforsøg og kompetitive bindingsforsøg. En slutkoncentration for hrER på 0,5 nM vil ofte opfylde denne betingelse.

▼M8

13. Hvis 20 %-kriteriet gentagne gange ikke kan opfyldes, kontrolleres forsøgssetuppet for potentielle fejl. Hvis 20 %-kriteriet ikke opfyldes, kan det tyde på, at der er meget lidt aktiv receptor i rekombinantbatchen, og det bør overvejes at anvende en anden receptorbatch.

Mætningsassay

14. Otte stigende koncentrationer af [^{3}H]17β-østradiol vurderes in triplo under følgende tre betingelser (jf. tabel 2):

— i fravær af umærket 17β-østradiol og under tilstedeværelse af ER Dette er bestemmelsen af den totale binding ved måling af radioaktiviteten i de brønde, som kun har [3H]17β-østradiol.

— under tilstedeværelse af en 1000-fold uforholdsmæssig koncentration af umærket 17β-østradiol i forhold til mærket 17β-østradiol og tilstedeværelse af ER. Formålet med denne betingelse er at mætte de aktive bindingssteder med umærket 17β-østradiol og, ved at måle radioaktiviteten i brøndene, bestemme den ikke-specifikke binding. Eventuelt tilbageværende varmt østradiol, som kan binde sig til receptoren, anses for at kunne binde sig til et ikke-specifikt sted, da koldt østradiol bør have en så høj koncentration, at det binder sig til alle tilgængelige specifikke steder på receptoren

— i fravær af umærket 17β-østradiol og af ER (bestemmelse af samlet radioaktivitet).

Fremstilling af [^{3}H]-17β-østradiol og umærkede 17β-østradiol-opløsninger

15. Fortyndinger af [^{3}H]-17β-østradiol fremstilles ved tilsætning af assaybuffer til en 12 nM stamopløsning af [^{3}H]-17β-østradiol for at opnå koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,12 nM til 12 nM. Ved at tilsætte 40 µl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (i en endelig mængde på 160 µl) fås den endelige assaykoncentration fra 0,03 til 3,0 nM. Fremstilling af assaybuffer, [^{3}H]-17β-østradiolstamopløsning og fortyndinger samt bestemmelse af koncentrationerne er beskrevet i detaljer i FW-protokollen (2).

16. Fortyndinger af 17β-østradiol-opløsninger i ethanol fremstilles ved at tilsætte assaybuffer for at få otte stigende koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,06 µM til 6 µM. Ved at tilsætte 80 µl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (i en endelig mængde på 160 µl) fremkommer de endelige assaykoncentrationer, der ligger fra 0,03 µM til 3 µM. Den endelige koncentration af umærket 17β-østradiol i brøndene i det enkelte ikke-specifikke bindingsassay bør være 1000 fold den mærkede [^{3}H]-17β-østradiolkoncentration. Fremstilling af fortyndinger af umærket 17β-østradiol er beskrevet i detaljer i FW-protokollen (2).

17. Den nominelle receptorkoncentration, som giver en specifik binding på 20 ± 5 %, bør anvendes (jf. punkt 12-13). hrERα-opløsningen fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

18. Mikrotiterpladerne med 96 brønde forberedes som illustreret i tabel 2 med 3 replikater pr. koncentration. Et eksempel på pladekoncentration og volumenfordeling af [^{3}H]-17β-østradiol, umærket 17β-østradiol, buffer og receptor er anført i tillæg 2.2.

▼**M8**

Tabel 2

Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Total binding (opløsningsmiddel)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER+ 0,10 μM E_2			Ikke-specifik binding
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17β-østradiol
ER: østrogenreceptor
E_2: Eumærket 17β-østradiol

19. Assaymikrotiterplader inkuberes ved 2-8 °C i 16-20 timer og anbringes på en rotator i inkubationsperioden.

Måling af [3H]-17β-østradiol bundet til hrERα

20. [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα separeres fra fri [^{3}H]-17β-østradiol ved at tilsætte 80 μl kold DCC-suspension til hver brønd, ryste mikrotiterpladerne i 10 minutter og centrifugere i 10 minutter ved omkring 2500 o/min. For at minimere dissociation af bundet [^{3}H]-17β-østradiol fra hrERα under denne proces er det særdeles vigtigt, at buffere og assaybrønde holdes mellem 2 og 8 °C, og at hvert skridt udføres hurtigt. En rysteanordning til mikrotiterplader er nødvendig for at behandle plader effektivt og hurtigt.

21. 50 μl supernatant, som indeholder hrERα-bundet [^{3}H]-17β-østradiol, bør herefter tages ekstremt forsigtigt for at undgå enhver kontaminering af brøndene ved kontakt med DCC og anbringes på en anden mikrotiterplade.

22. 200 μl scintillationsvæske, der kan omdanne kinetisk energi fra nukleare emissioner til lysenergi, tilsættes herefter til hver brønd (A1-B12 og D1 til E12). Brønd G1-H12 (identificeret som dpms i alt) udgør seriefortyndinger af [^{3}H]-17β-østradiol (40 μl), som bør hældes direkte i scintillationsvæsken i brøndene på målepladen som anført i tabel 3, dvs. at disse brønde kun indeholder 200 μl af scintillationsvæsken og den rette fortynding af [3H]-17β-østradiol. Disse mål viser, hvor meget [^{3}H]-17β-østradiol i dpms der blev tilsat til hvert sæt brønde til den totale binding og ikke-specifikke binding.

▼M8

Tabel 3

Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay, måling af radioaktivitet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E_2 + ER			Total binding (opløs-nings-middel)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 μM E_2			Ikke-specifik binding
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G	0,03 nM [3H] E_2 (dpms i alt)			0,06 nM [3H] E_2			0,08 nM [3H] E_2			0,10 nM [3H] E_2			dpms i alt (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2: [[3H]-17β-østradiol
ER: østrogenreceptor
E2: umærket 17β-østradiol
dpms: disintegrationer pr. minut
(*) De varme seriefortyndinger af [^{3}H]-mærket østradiol her tilsættes direkte til 200 μl scintillationsvæske i brønd G1 til H12.

23. Målingen indledes efter mindst 2 timer, og tælletiden bør være 40 minutter pr. brønd. Der bør anvendes en scintillationstæller til en mikrotiterplade til bestemmelse af dpm/brønd med korrektion for quenching. Er der ikke adgang til en scintillationstæller til mikrotiterplader, kan prøverne måles i en konventionel tæller. Under disse forhold kan det overvejes at nedsætte tælletiden.

Kompetitivt bindingsassay

24. Det kompetitive bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [^{3}H]-17β-østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Der bør anvendes tre sideløbende replikater ved hver koncentration inden for én analyseserie. Endvidere bør der udføres tre ikke-sideløbende analyseserier for hvert kemikalie, der testes. Assayet bør opsættes med en eller flere mikrotiterplader med 96 brønde.

Kontroller

25. Ved udførelsen af assayet medtages samtidig opløsningsmiddel og kontroller (dvs. referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) i hvert forsøg. Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle øvrige plader bør hver indeholde i) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder in triplo, ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især mindst in triplo. Procedurer for fremstilling af assaybuffer, kontroller, [^{3}H]-17β-østradiol, hrERα og testkemikalieopløsninger er beskrevet i reference 2 (bilag K, jf. FW-assayprotokol).

▼M8

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

26. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel viser, at opløsningsmidlet ikke interagerer med testsystemet og måler også total binding (TB). Ethanol er det foretrukne opløsningsmiddel. Såfremt den højeste koncentration af testkemikaliet ikke er opløseligt i ethanol, kan DMSO anvendes. Koncentrationen af ethanol eller DMSO, hvis det anvendes, i de endelige assaybrønde er 1,5 % og må ikke overstige 2 %.

Bufferkontrol

27. Bufferkontrollen (BC) bør hverken indeholde opløsningsmiddel eller testkemikalie, men alle assayets øvrige komponenter. Resultaterne af bufferkontrollen sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet.

Stærk binder (referenceøstrogen)

28. 17β-østradiol (CAS 50-28-2) er den endogene ligand og binder sig med høj affinitet til ER, undertype alfa. En standardkurve, som anvender umærket 17β-østradiol, fremstilles til hvert hrERα kompetitivt bindingsassay, så der kan foretages en variabilitetsvurdering ved gennemførelse af assayet over længere tid i det samme laboratorium. Otte opløsninger af umærket 17β-østradiol fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrønde i området 100 nM-10 pM (-7[logM] til -11[logM]), med følgende intervaller: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Den højeste koncentration af umærket 17β-østradiol (1 μM) tjener også som ikke-specifik bindingsindikator. Denne koncentration er angivet ved mærket "NSB" i tabel 4, selv om den også indgår i standardkurven.

Svag binder

29. En svag binder (norethynodrel (CAS 68-23-5) eller norethindron (CAS 68-22-4)) bør medtages for at påvise hvert forsøgs følsomhed og for at give mulighed for en vurdering af variabiliteten, når assayet udføres over længere tid. Otte opløsninger af den svage binder fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrøndene i området fra 3 nM til 30 μM (-8,5[logM] til -4,5[logM]) med følgende intervaller: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Ikke-binder

30. Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) bør anvendes som den negative kontrol (ikke-binder). Det giver sikkerhed for, at det med det udførte assay kan påvises, når testkemikalierne ikke binder sig til hrERα. Otte opløsninger af ikke-binderen fremstilles i ethanol med koncentrationer i assaybrøndene i området fra 0,1 nM til 1000 μM (-10[logM] til -3[logM]) i log-stigninger. Di-*n*-butylphthalat (DBP) kan bruges som en alternativ ikke-binder som kontrol. Det er påvist, at dens maksimale opløselighed er -4[logM].

hrERα-koncentration

31. Den mængde receptor, som giver en specifik binding på 20 ± 5 % af 1 nM radioaktivt mærket ligand (jf. punkt 12-13 i tillæg 2), bør anvendes. hrERα-opløsningen fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

[3H]-17β-østradiol

32. Koncentrationen af [^{3}H]-17β-østradiol i assaybrøndene skal være 1,0 nM.

▼M8

Testkemikalier

33. I første omgang er det nødvendigt at foretage en opløselighedstest for at fastslå opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testprotokollen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og yderligere bekræftes under assaybetingelser. Den endelige koncentration, som testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Områdebestemmelsen består af en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med otte log-seriefortyndinger, der begynder ved den maksimalt acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald (jf. også punkt 35). Testkemikaliet testes ved anvendelse af otte logaritmiske kurver beregnet efter koncentrationsintervaller som defineret ved den foregående test til bestemmelse af dosisinterval. Koncentrationer i det andet og tredje forsøg bør tilpasses, hvis det er relevant, for bedre at karakterisere koncentrationsresponskurven.

34. Fortyndinger af testkemikaliet fremstilles i et passende opløsningsmiddel (jf. punkt 26 i tillæg 2). Hvis den højeste koncentration af testkemikaliet ikke kan opløses i hverken ethanol eller DMSO, og tilsætning af mere opløsningsmiddel ville medføre, at opløsningsmiddelkoncentrationen i det endelige rør blev større end den acceptable grænse, kan den højeste koncentration reduceres til den næste lavere koncentration. I så fald kan en supplerende koncentration tilsættes i den lave ende af koncentrationsserien. Andre koncentrationer i serien bør forblive uændrede.

35. Testkemikalieopløsningerne bør overvåges nøje, når de tilsættes til assaybrønden, da testkemikaliet kan danne bundfald ved tilsætning til assaybrønden. Data for alle brønde, der indeholder bundfald, bør udelukkes fra kurvetilpasningen, og årsagen til udelukkelsen af data noteres.

36. Hvis der allerede findes oplysninger fra andre kilder, som angiver en log (IC_{50}) for et testkemikalie, kan det være hensigtsmæssigt at sætte en geometrisk afstand mellem fortyndingerne (dvs. 0,5 logenheder omkring den forventede log(IC_{50})). Det endelige resultat bør afspejle en tilstrækkelig spredning af koncentrationer på begge sider af log(IC_{50}), herunder "top" og "bund", således at bindingskurven kan karakteriseres tilstrækkeligt.

Organisering af assaypladen

37. Mærkede mikrotiterplader bør forberedes under hensyntagen til seksdobbelte inkubationer med koder for kontrolkultur med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af referenceøstrogenet, der også fungerer som indikator for ikke-specifik binding (NSB) og bufferkontrol, og under hensyntagen til tredobbelte inkubationer med koder for hver af de otte koncentrationer af den ikke-bindende kontrol (octyltriethoxysilan), de syv lavere koncentrationer for referenceøstrogenet, de otte koncentrationsdosisniveauer for den svage binder og de otte koncentrationer af hvert testkemikalie. Et eksempel på layout for pladediagrammet til de fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontrol er anført nedenfor i tabel 4. Supplerende mikrotiterplader bruges til testkemikalier og bør omfatte pladekontroller, dvs.: 1) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder in triplo, 2) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især seksdobbelt (tabel 5). Et eksempel på arbejdsark til layout for en mikrotiterplade til et kompetitivt assay, der anvender tre ukendte

▼M8

testkemikalier, er anført i tillæg 2.3. De koncentrationer, som er angivet i tabel 4 og 5, er assayets endelige koncentrationer. Den maksimale koncentration for E2 bør være 1×10^{-7} M, og for den svage binder bør den højeste anvendte koncentration for den svage binder på plade 1 anvendes. IC_{50}-koncentrationen skal bestemmes af laboratoriet på grundlag af deres historiske kontroldatabase. Det forventes, at denne værdi vil ligne den, der blev observeret i valideringsundersøgelserne (jf. tabel 1).

Tabel 4

Layout for mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (plade 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (kun opløsningsmiddel)			TB (kun opløsningsmiddel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Blindprøve (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	Blindprøve (til varm) (**)			Blindprøve (til varm) (**)			Bufferkontrol			Bufferkontrol		

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)
(*) reel blindprøve, brønd ikke benyttet
(**)blindprøve ikke anvendt under inkubationen, men anvendt til at bekræfte den samlede tilsatte radioaktivitet.

Tabel 5

Layout til mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, fulde koncentrationskurver til testkemikalier og pladekontroller

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (kun opløsningsmiddel)			TB (kun opløsningsmiddel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE (1×10-4,5)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10-7)		

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

▼M8

Gennemførelse af kompetitivt bindingsassay

38. Som vist i tabel 6 tilsættes 80 µl kontrolkultur med opløsningsmiddel, bufferkontrol, referenceøstrogen, svag binder, ikke-binder og testkemikalier fremstillet i assaybuffer til brøndene. Herefter tilsættes 40 µl af en 4 nM [3H]-17β-østradiolopløsning til hver enkelt brønd. Efter en let rotation i 10-15 minutter ved 2-8 °C tilsættes 40 µl hrERα-opløsning. Assaymikrotiterpladerne inkuberes ved 2-8 °C i 16-20 timer og anbringes på en rotator i inkubationsperioden.

Tabel 6

Mængde af assaykomponenter til kompetitivt bindingsassay med hrER, mikrotiterplader

Mængde (µl)	Indholdsstof
80	Umærket 17β-østradiol, norethynodrel, OTES, testkemikalier, opløsningsmiddel eller buffer
40	4 nM [3H]-17β-østradiolopløsning
40	hrERα-opløsning, koncentration som bestemt
160	***Samlet mængde i hver assaybrønd***

39. Kvantificeringen af [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα efter separation af [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα fra fri [^{3}H]-17β-østradiol ved at tilsætte 80 µl kold DCC-suspension til hver brønd bør herefter udføres som beskrevet i punkt 20-23 for mætningsbindingsassayet.

40. Brønd H1-6 (identificeret som blindprøve (til varm) i tabel 4) repræsenterer dpms i [^{3}H]-mærket østradiol i 40 µl. Delprøven på 40 µl hældes direkte i scintillationsvæsken i brønd H1-H6.

Acceptkriterier

Mætningsbindingsassay

41. Den specifikke bindingskurve bør nå et plateau i takt med anvendelsen af stigende koncentrationer af [^{3}H]-17β-østradiol, hvilket viser mætningen af hrERα med ligand.

42. Den specifikke binding ved 1 nM [3H]-17β-østradiol bør ligge inden for det acceptable område på 15-25 % af den gennemsnitlige målte samlede radioaktivitet, der tilsættes på tværs af analyseserier. Lejlighedsvise lette udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyseserie ligger væsentligt uden for dette område, bør proteinkoncentrationen justeres, og mætningsassayet gentages.

43. Dataene bør generere et lineært Scatchard-plot.

44. Den ikke-specifikke binding bør ikke være uforholdsmæssigt stor. Værdien for den ikke-specifikke binding bør typisk være < 35 % af den totale binding. Forholdet kan dog undertiden overstige denne grænse ved måling af en meget lav dpm for den laveste testede koncentration af radioaktivt mærket 17β-østradiol.

▼**M8**

Kompetitivt bindingsassay

45. Stigende koncentrationer af umærket 17β-østradiol bør fortrænge [^{3}H]-17β-østradiol fra receptoren på en måde, der stemmer overens med en kompetitiv binding ét sted.

46. IC_{50}-værdien for referenceøstrogenet (dvs. 17β-østradiol) bør omtrent svare til den molære koncentration af [^{3}H]-17β-østradiol plus den Kd, der er bestemt ud fra mætningsbindingsassayet.

47. Den samlede specifikke binding bør til stadighed ligge inden for det acceptable område på 20 ± 5 %, når den gennemsnitlige målte koncentration af den samlede radioaktivitet, som tilsættes til hver brønd, var 1 nM på tværs af analyseserier. Lejlighedsvise lette udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyseserie ligger væsentligt uden for området, bør proteinkoncentrationen justeres.

48. Opløsningsmidlet bør ikke ændre assayets følsomhed eller reproducerbarhed. Resultaterne af kontrolkulturen med opløsningsmiddel (TB-brønde) sammenlignes med bufferkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet. Resultaterne af TB og bufferkontrol bør være sammenlignelige, hvis opløsningsmidlet ikke påvirker assayet.

49. Ikke-binderen bør ikke fortrænge mere end 25 % af [^{3}H]-17β-østradiol fra hrERα ved test op til 10^{-3} M (OTES) eller 10^{-4} M (DBP).

50. Der blev udviklet ydeevnekriterier for referenceøstrogen og to svage bindere (f.eks. norethynodrel, norethindron) ved hjælp af data fra valideringsundersøgelsen af FW hrER-bindingsassayet (bilag N i reference 2). Der er anført 95 %-konfidensintervaller for den gennemsnitlige (n) +/- standardafvigelse for alle kontrolanalyseserier på tværs af de laboratorier, der deltog i valideringsundersøgelsen. Der blev beregnet 95 %-konfidensintervaller for de kurvetilpassede parametre (dvs. top, bund, Hills kurve, $logIC_{50}$) for referenceøstrogen og svage bindere og for $log_{10}RBA$ af de svage bindere i forhold til referenceøstrogen, og de angives som ydeevnekriterier for positive kontroller. Tabel 1 viser forventede intervaller for kurvetilpassede parametre, der kan benyttes som ydeevnekriterier. I praksis kan området for IC_{50} variere lidt baseret på Kd af receptorpræparatet og ligandkoncentrationen.

51. Der blev ikke udviklet ydeevnekriterier for kurvetilpassede parametre til testkemikalier på grund af den brede vifte af eksisterende potentielle testkemikalier og variation i potentielle affiniteter og udfald (f.eks. fuld kurve, delkurve, ingen kurvetilpasning). Der bør dog anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyseserie for et testkemikalie. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliet for klart at definere toppen (f.eks. 90-100 % af bindingen) af den kompetitive kurve. Variabiliteten mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliet samt mellem de tre ikke-sideløbende analyseserier skal være rimelig og videnskabeligt forsvarlig. Kontroller fra hver analyseserie for et testkemikalie skal tilnærmes resultatmålinger rapporteret for dette FW-assay og skal stemme overens med tidligere kontroldata fra de respektive laboratorier.

▼M8

ANALYSE AF DATA

Mætningsbindingsassay

52. Der måles både samlet og ikke-specifik binding. På grundlag af disse værdier beregnes specifik binding af stigende koncentrationer af [^{3}H]-17β-østradiol under ligevægtsbetingelser ved fratrækning af ikke-specifik binding fra samlet binding. En graf over specifik binding i forhold til [^{3}H]-17β-østradiol-koncentration bør nå et plateau for maksimal specifik binding som tegn på mætning af hrERα med [^{3}H]-17β-østradiol. Endvidere bør analyse af data dokumentere bindingen af [^{3}H]-17β-østradiol til et enkelt bindingssted med høj affinitet. Ikke-specifik, samlet og specifik binding bør vises på en mætningsbindingskurve. Ved yderligere analyse af disse data bør der benyttes en ikke-lineær regressionsanalyse (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) med en endelig visning af data som et Scatchard-plot.

53. Dataanalysen skal bestemme Bmax og Kd på grundlag af de totale bindingsdata alene ud fra den antagelse, at ikke-specifik binding er lineær, medmindre der gives en begrundelse for at benytte en anden metode. Der bør desuden benyttes en robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Der bør altid korrigeres for liganddepletering (f.eks. ved hjælp af Swillens metode, 1995) ved bestemmelse af Bmax og Kd ud fra mætningsbindingsdata.

Kompetitivt bindingsassay

54. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^{3}H]-17β-østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log10-enheder). Den koncentration af testkemikaliet, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^{3}H]-17β-østradiolbinding, er IC_{50}-værdien.

55. Skøn over log(IC_{50})-værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Top, bund, hældning og log(IC_{50}) skal normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Der bør ikke korrigeres for liganddepletion. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder beregnes som en procentdel af log (IC_{50}) for den svage binder i forhold til log (IC_{50}) for 17β-østradiol. Resultaterne fra de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved hjælp af målinger af assayets ydeevne i punkt 45-50 i dette tillæg 2.

56. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Det anbefales, at hver analyseserie for et testkemikalie indledningsvis gennemgår en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder (jf. punkt 55 ovenfor). Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvise specifikt bundne [^{3}H]-17β-østradiol, lave variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver kemisk koncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev gennemført korrekt.

▼M8

Fortolkning af data

57. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en binder for hrERα, hvis der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er under 50 % (figur 1).

58. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en ikke-binder for hrERα, hvis:

— der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet ligger over 75 %, eller

— der ikke kan tilpasses en bindingskurve, og den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene ligger over 75 %.

59. Testkemikalierne anses for usikre, hvis ingen af de ovennævnte betingelser er opfyldt (f.eks. det laveste punkt på den tilpassede responskurve ligger mellem 76 og 51 %).

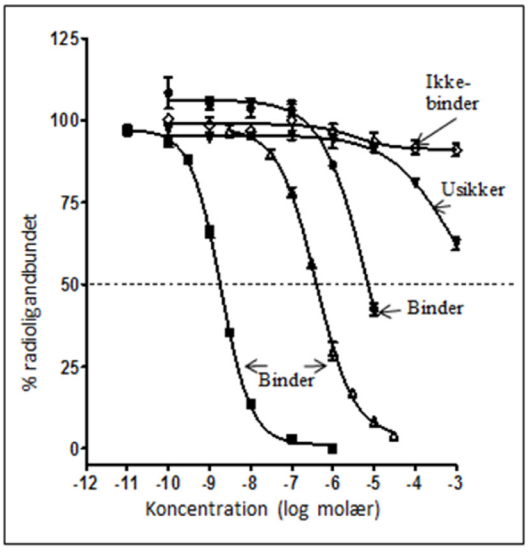
Tabel 7

Kriterier for klassificering på grundlag af et testkemikalies kompetitive bindingskurve.

Klassificering	Kriterier
Binder[a]	En bindingskurve kan tilpasses. Det **laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er mindre end 50 %.**
Ikke-binder[b]	Hvis en bindingskurve kan tilpasses, er det **laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet over 75 %.** Hvis en bindingskurve ikke kan tilpasses, er den **laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene over 75 %.**
Usikker[c]	Enhver testbar analyseserie, som hverken er en binder eller en ikke-binder s (*f.eks.* Det laveste punkt på den tilpassede responskurve er mellem 76 % og 51 %).

Figur 1

Eksempler på klassificering af testkemikalier ved anvendelse af kompetitiv bindingskurve



▼M8

60. Flere analyseserier for et testkemikalie, der gennemføres i et laboratorium, kombineres ved at tildele hver analyseserie en numerisk værdi og beregne gennemsnittet på tværs af analyseserierne som vist i tabel 8. Resultater for de kombinerede analyseserier i hvert laboratorium sammenlignes med den forventede klassificering for hvert testkemikalie.

Tabel 8

Metode til klassificering af testkemikalier ved anvendelse af flere analyseserier i et laboratorium

Tildeling af værdi til hver analyseserie:	
Klassificering	**Numerisk værdi**
Binder	2
Usikker	1
Ikke-binder	0
Klassificering af gennemsnitlig numerisk værdi på tværs af analyseserier:	
Klassificering	**Numerisk værdi**
Binder	Gennemsnit $\geq$ 1,5
Usikker	0,5 $\leq$ Gennemsnit < 1,5
Ikke-binder	Gennemsnit < 0,5

TESTRAPPORT

61. Jf. punkt 24 i "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode.

▼**M8**

Tillæg 2.1

TERMINOLOGI

[^{3}H]E2: 17β-østradiol radioaktivt mærket med tritium

DCC: dextranovertrukket trækul

E_2: umærket 17β-østradiol (inert)

Assaybuffer: 10 mM tris, 10 mg bovint serumalbumin/ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5

hrERα: human rekombinant østrogenreceptor alfa

Replikat: en af flere brønde, der har samme indhold ved de samme koncentrationer, og som analyseres sideløbende inden for én analyseserie. I denne protokol testes hver koncentration af testkemikaliet in triplo, dvs. at der er tre replikater, som analyseres samtidig ved hver koncentration af testkemikaliet.

Analyseserie: et fuldstændigt sæt assaybrønde på mikrotiterplade, der kører sideløbende, og som giver alle nødvendige oplysninger til at karakterisere bindingen af et testkemikalie til hrERα (nemlig samlet [^{3}H]-17β-østradiol tilsat til assaybrønden, maksimal binding af [^{3}H]-17β-østradiol til hrERα, ikke-specifik binding og total binding ved forskellige koncentrationer af testkemikaliet). En analyseserie kan bestå af så lidt som én assaybrønd (dvs. replikat) pr. koncentration, men eftersom denne protokol kræver tredobbelt analyse, består én analyseserie af tre assaybrønde pr. koncentration. Endvidere kræver denne protokol tre uafhængige (dvs. ikke-sideløbende) analyseserier pr. kemikalie.

▼**M8**

Tillæg 2.2

TYPISK [^{3}H]-17B-ØSTRADIOLMÆTNINGSASSAY MED TRE REPLIKATBRØNDE

Typisk [3H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde

Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskoncentration (nM)	Varm E2 Volumen (µl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskoncentration (µM)	Kold E2 Volumen (µl)	Kold E2 Slutkoncentration (µM)	Buffervolumen (µl)	Receptorvolumen (µl)	Samlet volumen i brøndene
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼M8

Typisk [3H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde

Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskoncentration (nM)	Varm E2 Volumen (µl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskoncentration (µM)	Kold E2 Volumen (µl)	Kold E2 Slutkoncentration (µM)	Buffervolumen (µl)	Receptorvolumen (µl)	Samlet volumen i brøndene
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼M8

Typisk [3H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde

Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskoncentration (nM)	Varm E2 Volumen (µl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskoncentration (µM)	Kold E2 Volumen (µl)	Kold E2 Slutkoncentration (µM)	Buffervolumen (µl)	Receptorvolumen (µl)	Samlet volumen i brøndene
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Varm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Varm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Varm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Varm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Typisk [3H]-17β-østradiolmætningsassay med tre replikatbrønde

Placering	Replikat	Kode for brøndtype	Varm E2 Begyndelseskoncentration (nM)	Varm E2 Volumen (µl)	Varm E2 Slutkoncentration (nM)	Kold E2 Begyndelseskoncentration (µM)	Kold E2 Volumen (µl)	Kold E2 Slutkoncentration (µM)	Buffervolumen (µl)	Receptorvolumen (µl)	Samlet volumen i brøndene
H1	1	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Varm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Varm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Varm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Varm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 40 µl tilsættes kun til scintillationstælling.

▼**M8**

Tillæg 2.3

KOMPETITIVT BINDINGSASSAY: BRØNDLAYOUT

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	A1	1	total binding	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	total binding	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	total binding	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	total binding	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	total binding	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	total binding	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	kold E2	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	B5	2	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	kold E2	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	kold E2	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	kold E2	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	kold E2	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	kold E2	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	C9	3	kold E2	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blindprøve	blind-prøve	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	blindprøve	blind-prøve	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	blindprøve	blind-prøve	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	norethy-nodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethy-nodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethy-nodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethy-nodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethy-nodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethy-nodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	norethy-nodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethy-nodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethy-nodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethy-nodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethy-nodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	norethy-nodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethy-nodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethy-nodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethy-nodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	E8	2	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethy-nodrel	NE	WP	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrationskode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	H1	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	varm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	bufferkontrol	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 40 µl tilsættes kun til scintillationstælling.

▼M8

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
P1	A1	1	total binding	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	total binding	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	total binding	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	total binding	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	total binding	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	total binding	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	kold E2 (høj)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Testkemikalie 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Testkemikalie 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Testkemikalie 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Testkemikalie 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼**M8**

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
P1	C1	1	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Testkemikalie 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Testkemikalie 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Testkemikalie 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Testkemikalie 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Testkemikalie 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Testkemikalie 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Testkemikalie 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Testkemikalie 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout												
Plade	**Placering**	**Replikat**	**Brøndtype**	**Brøndkode**	**Koncentrations-kode**	**Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)**	**hrER-stamkultur (µl)**	**Buffervolumen (µl)**	**Sporstof (varm E2) Volumen (µl)**	**Volumen fra fortyndingsplade (µl)**	**Slutvolumen (µl)**	**Konkurrent Slutkoncentration (M)**
P1	E1	1	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Testkemikalie 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E4	1	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Testkemikalie 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Testkemikalie 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Testkemikalie 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Testkemikalie 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Testkemikalie 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Testkemikalie 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Kompetitivt bindingsassay: brøndlayout

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelseskoncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkoncentration (M)
P1	G1	1	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Testkemikalie 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Testkemikalie 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Testkemikalie 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Testkemikalie 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kold E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kold E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kold E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kold E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Tillæg 3

CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE'S (CERI) IN VITRO-ASSAY VEDRØRENDE ØSTROGENRECEPTORBINDING VED ANVENDELSE AF ET LIGANDBINDINGSDOMÆNE AF HUMANT REKOMBINANT ERA-PROTEIN

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

1. Dette in vitro-assay vedrørende østrogenreceptor(ERα)-mætning og kompetitiv binding anvender et ligandbindingsdomæne (LBD) af humant ERα (hrERα). Denne proteinmodel blev produceret af Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan og findes som et glutathion-S-transferase (GST) fusionsprotein og udtrykkes i *E. coli.* CERI-protokollen gennemgik en international valideringsundersøgelse (2) i flere laboratorier, der har påvist dens relevans og pålidelighed i forbindelse med assayets tilsigtede formål.

2. Assayet er en screeningsprocedure til påvisning af stoffer, der kan binde sig til hrERα. Det bruges til at bestemme et testkemikalies evne til at konkurrere med 17β-østradiol om binding til hrERα-LBD. Kvantitative assayresultater kan omfatte IC_{50} (et mål for den koncentration af testkemikaliet, der er nødvendig for at fortrænge halvdelen af [^{3}H]-17β-østradiol fra hrERα), og testkemikaliernes relative affiniteter for hrERα sammenlignet med 17β-østradiol. Til kemikaliescreeningsformål kan acceptable kvalitative assayresultater omfatte klassificeringer af testkemikalier som enten hrERα-bindere, ikke-bindere eller usikre baseret på kriterier beskrevet for bindingskurver.

3. Assayet anvender en radioaktivt mærket ligand, som kræver, at laboratoriet har licens til radioaktive materialer. Alle procedurer med radioisotoper og farlige kemikalier skal følge forskrifter og procedurer som beskrevet i national lovgivning.

4. Afsnittene **"GENEREL INDLEDNING"** og **"hrER-BINDINGS-ASSAYETS KOMPONENTER"** skal læses, før dette assay benyttes til lovmæssige formål. Definitioner og forkortelser, der benyttes i denne testvejledning, er beskrevet i tillæg 1.

PRINCIPPER FOR ASSAYET (JF. OGSÅ GENEREL INDLEDNING)

5. hrERα-bindingsassayet måler en radioaktivt mærket ligands ([^{3}H]17β-østradiol) evne til at binde sig til ER under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie (dvs. konkurrent). Testkemikalier, som har en høj ER-affinitet, konkurrerer med den radioaktivt mærkede ligand ved en lavere koncentration sammenlignet med kemikalier med lavere affinitet for receptoren.

6. Dette assay består af to vigtige komponenter: et mætningsbindingsforsøg for at karakterisere parametrene for interaktion mellem receptor og ligand efterfulgt af et forsøg med kompetitiv binding, der karakteriserer konkurrencen mellem et testkemikalie og en radioaktivt mærket ligand for binding til ER.

▼M8

7. Formålet med mætningsbindingsforsøget er at karakterisere en særlig batch af receptorer for affinitet og antal i forberedelsen af det kompetitive bindingsforsøg. Mætningsbindingsforsøget måler, under ligevægtsbetingelser, en fast østrogenreceptorkoncentrations affinitet for dens naturlige ligand (repræsenteret ved dissociationskonstanten, Kd) og koncentrationen af aktive receptorsteder (Bmax).

8. Det kompetitive bindingsforsøg måler et stofs affinitet til at konkurrere med [^{3}H]17β-østradiol med hensyn til binding til ER. Affiniteten kvantificeres af koncentrationen af testkemikaliet, som under ligevægtsbetingelser inhiberer 50 % af den specifikke binding af [^{3}H]17β-østradiol (kaldet den "inhiberende koncentration på 50 %" eller IC_{50}). Denne kan også vurderes ved hjælp af den relative affinitet (RBA, i forhold til IC_{50} af østradiol målt separat i den samme analyseserie). Det kompetitive bindingsforsøg måler bindingen af [^{3}H]17β-østradiol ved en fast koncentration under tilstedeværelse af en bred vifte (otte størrelsesordener) af testkemikaliekoncentrationer. Dataene tilpasses herefter, hvor det er muligt, så de danner Hill-ligningen (Hill, 1910), der beskriver en kompetitiv binders fortrængning af den radioaktive ligand ét sted. Omfanget af fortrængningen af det radioaktivt mærkede østradiol ved ligevægt anvendes til at karakterisere testkemikaliet som en binder, ikke-binder eller som et kemikalie, der genererer en usikker respons.

FREMGANGSMÅDE

Påvisning af acceptabel ydeevne for hrERα-protein

9. Før der rutinemæssigt udføres mætningsassays og kompetitive bindingsassays, skal det påvises, at hver ny batch hrERα fungerer korrekt i det laboratorium, hvor det vil blive anvendt. Ydeevnen påvises gennem en totrinsproces. Det drejer sig om følgende trin:

— Der udføres et [3H]-17β-østradiol-mætnings- og bindingsassay for at påvise hrERα-specificitet og mætning. Ikke-lineær regressionsanalyse af disse data (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og det efterfølgende Scatchard-plot bør dokumentere hrERα-affiniteten for [3H]-17β-østradiol (Kd) og antallet af receptorer (Bmax) for en bestemt batch hrERα.

— Der udføres et kompetitivt bindingsassay ved anvendelse af kontrolstofferne (referenceøstrogen (17β-østradiol), en svag binder (f.eks. norethynodrel eller norethindron) og en ikke-binder (octyltriethoxysilan, OTES). Hvert laboratorium bør oprette en historisk database for at dokumentere konsistensen af IC50 og de relevante værdier for referenceøstrogenet og den svage binder blandt forsøg og forskellige batcher af hrERα. Parametrene for de kompetitive bindingskurver for kontrolstofferne bør desuden ligge inden for de grænser for konfidensintervallet på 95 % (jf. tabel 1), der blev udviklet ved hjælp af data fra laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen for dette assay (2).

Tabel 1

Ydeevnekriterier udviklet for referenceøstrogen og svage bindere, CERI's hrER-bindingsassay

Stof	Parameter	Gennemsnit [a]	Standard-afvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller [b]	
				Nedre grænse	Øvre grænse
17β-østradiol	Top	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Bund	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Stof	Parameter	Gennemsnit [a]	Standard-afvigelse (n)	95 %-konfidensintervaller [b]	
				Nedre grænse	Øvre grænse
	Hills kurve	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Norethynodrel	Top	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Bund	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hills kurve	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Norethindron [c]	Top	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Bund	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hills kurve	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

([a]) Gennemsnit ± standardafvigelse med prøvestørrelse (n) blev beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) til kontrolanalyseserier udført i fire laboratorier under valideringsundersøgelsen (jf. bilag N i reference 2).

([b]) 95 % konfidens anføres som en rettesnor for acceptkriterier.

([c]) Testning af norethindron var valgfri for delopgave 4 under valideringsundersøgelsen (jf. reference 2, delopgave 4). Således blev gennemsnittet ± standardafvigelse (n) beregnet ved hjælp af kurvetilpassede skøn (Hill-ligning med fire parametre) for kontrol-analyseserier udført i to laboratorier.
Intervallet for IC_{50} vil afhænge af Kd af receptorpræparatet og koncentrationen af den radioaktivt mærkede ligand, som anvendes i det enkelte laboratorium. En passende justering af IC_{50}-intervallet baseret på betingelserne for udførelse af assayet vil være acceptabel.

Påvisning af laboratoriets kompetence

10. Jf. punkt 17 og 18 og tabel 2 i afsnittet "**hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER**" i denne forsøgsmetode. Hvert assay (mætning og kompetitiv binding) bør bestå af tre uafhængige analyseserier (dvs. friske fortyndinger af receptor, kemikalier og reagenser) på forskellige dage, og hver analyseserie bør indeholde tre replikater.

Bestemmelse af receptor(hrERα)koncentration

11. Den aktive receptorkoncentration varierer lidt efter batch og opbevaringsforhold. Af denne grund bør den koncentration af aktiv receptor, der modtages fra leverandøren, bestemmes. Dette vil give den rette koncentration af aktiv receptor på tidspunktet for analyseserien.

12. Under forhold svarende til kompetitiv binding (dvs. 0,5 nM [^{3}H]-østradiol) bør nominelle koncentrationer på 0,1, 0,2, 0,4 og 0,6 nM receptor inkuberes i fravær af (total binding) og under tilstedeværelse (ikke-specifik binding) af 1 μM umærket østradiol. Specifik binding beregnet som forskellen mellem

▼M8

total og ikke-specifik binding afsættes i forhold til den nominelle receptorkoncentration. Den receptorkoncentration, som giver specifikke bindingsværdier svarende til 40 % af de tilsatte radioaktivt mærkede stoffer, hænger sammen med den tilsvarende receptorkoncentration, og denne receptorkoncentration anvendes til mætningsforsøg og kompetitive bindingsforsøg. En slutkoncentration for hrER på 0,2 nM vil ofte opfylde denne betingelse.

13. Hvis 40 %-kriteriet gentagne gange ikke kan opfyldes, kontrolleres forsøgssetuppet for potentielle fejl. Hvis 40 %-kriteriet ikke opfyldes, kan det tyde på, at der er meget lidt aktiv receptor i rekombinantbatchen, og det bør overvejes at anvende en anden receptorbatch.

Mætningsassay

14. Otte stigende koncentrationer af [^{3}H]17β-østradiol vurderes in triplo under følgende tre betingelser (jf. tabel 2):

a. i fravær af umærket 17β-østradiol og under tilstedeværelse af ER Dette er den kvantitative analyse af den totale binding ved måling af radioaktiviteten i de brønde, som kun har [^{3}H]17β-østradiol

b. under tilstedeværelse af en 2000-fold uforholdsmæssig koncentration af umærket 17β-østradiol i forhold til mærket 17β-østradiol og tilstedeværelse af ER. Formålet med denne betingelse er at mætte de aktive bindingssteder med umærket 17β-østradiol og, ved at måle radioaktiviteten i brøndene, bestemme den ikke-specifikke binding. Eventuelt tilbageværende varmt østradiol, som kan binde sig til receptoren, anses for at kunne binde sig til et ikke-specifikt sted, da koldt østradiol bør have en så høj koncentration, at det binder sig til alle tilgængelige specifikke steder på receptoren

c. i fravær af umærket 17β-østradiol og af ER (bestemmelse af samlet radioaktivitet).

Fremstilling af [^{3}H]-17β-østradiol, umærkede 17β-østradiol-opløsninger og hrERα

15. En 40 nM-opløsning af [^{3}H]-17β-østradiol fremstilles af en 1 μM stamopløsning af [^{3}H]-17β-østradiol i DMSO ved at tilsætte DMSO (for at fremstille 200 nM) og assaybuffer ved stuetemperatur (for at fremstille 40 nM). Ved hjælp af denne 40 nM-opløsning fremstilles serierne af [^{3}H]-17β-østradiolfortyndinger i et område fra 0,313 nM til 40 nM med assaybuffer ved stuetemperatur (som vist i kolonne 12 i tabel 2). Assayets slutkoncentrationer i området fra 0,0313 til 4,0 nM fås ved at tilsætte 10 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde (jf. tabel 2 og 3). Fremstilling af assaybuffer, beregning af den originale stamopløsning af [^{3}H]-17β-østradiol baseret på dens specifikke aktivitet, fremstilling af fortyndinger og bestemmelse af koncentrationerne er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).

16. Fortyndinger af opløsninger af umærket 17β-østradiol fremstilles af en stamopløsning af 1 nM 17β-østradiol ved tilsætning af assaybuffer for at få otte stigende koncentrationer, der indledningsvis ligger fra 0,625 μM til 80 μM. Assayets slutkoncentrationer i området fra 0,0625 til 8 nM fås ved at tilsætte 10 μl af disse opløsninger til de respektive assaybrønde på en mikrotiterplade med 96 brønde til måling af ikke-specifik binding (jf. tabel 2 og 3). Fremstilling af fortyndinger af umærket 17β-østradiol er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).

▼**M8**

17. Den receptorkoncentration, som giver 40 ± 10 % specifik binding, bør anvendes (jf. punkt 12-13). hrERα-opløsningen bør fremstilles med iskold assaybuffer umiddelbart før brug, dvs. efter at alle brønde til total binding, ikke-specifik binding og varm ligand alene er blevet fremstillet.

18. Mikrotiterpladerne med 96 brønde forberedes som illustreret i tabel 2 med 3 replikater pr. [^{3}H]-17β-østradiolkoncentration. Volumenfordelingen af [^{3}H]-17β-østradiol, umærket 17β-østradiol, buffer og receptor er anført i tabel 3.

Tabel 2

Layout for en mikrotiterplade til mætningsbindingsassay

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Til måling af TB			Til måling af NSB			Til bestemmelse af varm ligand alene				Umærkede E2-fortyndinger til pladekolonne 4-6.	[3H]E2-fortyndinger til pladekolonne 1-9.
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB- total binding
NSB- ikke-specifik binding
[^{3}H] E_2- [^{3}H]17β-østradiol
E2- umærket 17β-østradiol
(*) De her angivne koncentrationer er slutkoncentrationer i hver brønd.
(**) Fortyndingerne af umærket E2 og [^{3}H]E2 kan fremstilles i på anden plade.

▼M8

Tabel 3

Reagensmængder til mætningsmikrotiterpladen

Kolonnenummer		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Fremstillingstrin		TB-brønde			NSB-brønde			Varm ligand alene		
Komponentvolumen til reaktionsbrønde og tilsætningsrækkefølge	Buffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	umærket E2 fra kolonne 11 i tabel 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 fra kolonne 12 i tabel 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Samlet reaktionsvolumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		**REAKTION EFTER 2 TIMERS INKUBATION**						Kvantificering af radioaktivitet lige efter fremstilling. Ingen inkubation		
Behandling med 0,4 % DCC		Ja			Ja			**Nej**		
Volumen af 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtrering		Ja			Ja			Nej		
MÅLING AF DPMS										
Kvantificeringsvolumen tilsat til scintillationscocktail		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Hvis der anvendes en LSC til mikroplader til måling af dpms, er fremstilling af varm ligand alene på den samme assayplade med TB- og NSB-brønde ikke hensigtsmæssig. Den varme ligand alene bør fremstilles på en anden plade.

(**) Hvis DCC separeres ved centrifugering, bør de 50 µl supernatant måles med LSC for at undgå kontaminering af DCC.

19. Assaymikrotiterplader til bestemmelse af total binding og ikke-specifik binding inkuberes ved stuetemperatur (22-28 °C) i to timer.

Måling af [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα

20. Efter inkubationsperioden på to timer bør [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα separeres fra fri [^{3}H]-17β-østradiol ved tilsætning af 100 µl iskold 0,4 % DCC-suspension til brøndene. Pladerne anbringes herefter på is i 10 minutter, og reaktionsblandingen og DCC-blandingen filtreres ved overførsel til et mikrotiterpladefilter for at fjerne DCC. 100 µl af filtratet tilsættes herefter til scintillationsvæsken i LSC-glas til bestemmelse af disintegration pr. minut (dpms) pr. glas ved væskescintillationstælling.

▼M8

21. Er der ikke adgang til et mikropladefilter, kan DCC fjernes ved centrifugering. 50 µl supernatant, der indeholder hrERα-bundet [^{3}H]-17β-østradiol, tages herefter ekstremt forsigtigt for at undgå enhver kontaminering af brøndene ved kontakt med DCC og anvendes til scintillationstælling.

22. Betingelsen om den varme ligand alene anvendes til bestemmelse af disintegration pr. minut (dpm) af [^{3}H]-17β-østradiol tilsat til assaybrøndene. Radioaktiviteten kvantificeres lige efter fremstillingen. Disse brønde bør ikke inkuberes og bør ikke behandles med DCC-suspension, men deres indhold bør hældes direkte i scintillationsvæsken. Disse mål viser, hvor meget [^{3}H]-17β-østradiol i dpms der blev tilsat til hvert sæt brønde til den totale binding og ikke-specifikke binding.

Kompetitivt bindingsassay

23. Det kompetitive bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [^{3}H]-17β-østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Der bør anvendes tre sideløbende replikater ved hver koncentration inden for én analyseserie. Endvidere bør der udføres tre ikke-sideløbende analyseserier for hvert kemikalie, der testes. Assayet bør opsættes med en eller flere mikrotiterplader med 96 brønde.

Kontroller

24. Ved udførelsen af assayet medtages samtidig opløsningsmiddel og kontroller (dvs. referenceøstrogen, svag binder og ikke-binder) i hvert forsøg. Fuldstændige koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (dvs. svag binder og ikke-binder) anvendes på én plade under hver analyseserie. Alle andre plader bør indeholde i) en høj- (maksimal fortrængning dvs. næsten fuld fortrængning af radioaktivt mærket ligand) og medium- (næsten IC_{50}) koncentration med E2 og svag binder in triplo ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel og ikke-specifik binding, hver især in triplo. Procedurer for fremstilling af assaybuffer, [^{3}H]-17β-østradiol, hrERα og testkemikalieopløsninger er beskrevet i detaljer i CERI-protokollen (2).

Kontrolkultur med opløsningsmiddel

25. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel viser, at opløsningsmidlet ikke interagerer med testsystemet og måler også total binding (TB). DMSO er det foretrukne opløsningsmiddel. Såfremt den højeste koncentration af testkemikaliet ikke er opløseligt i DMSO, kan ethanol anvendes. DMSO-koncentrationen i slutassaybrøndene bør ligge på 2,05 % og kan øges op til 2,5 % i tilfælde af testkemikaliets manglende opløselighed. DMSO-koncentrationer over 2,5 % bør ikke anvendes, fordi højere koncentrationer af opløsningsmidlet interfererer med assayet. For testkemikalier, som ikke er opløselige i DMSO, men er opløselige i ethanol, kan der højst anvendes 2 % ethanol i assayet uden interferens.

Bufferkontrol

26. Bufferkontrollen (BC) bør hverken indeholde opløsningsmiddel eller testkemikalie, men alle assayets øvrige komponenter. Resultaterne af bufferkontrollen sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet.

▼**M8**

Stærk binder (referenceøstrogen)

27. 17β-østradiol (CAS 50-28-2) er den endogene ligand og binder sig med høj affinitet til ER, undertype alfa. En standardkurve, som anvender umærket 17β-østradiol, fremstilles til hvert hrERα kompetitivt bindingsassay, så der kan foretages en variabilitetsvurdering ved gennemførelse af assayet over længere tid i det samme laboratorium. Otte opløsninger af umærket 17β-østradiol fremstilles i DMSO og assaybuffer med slutkoncentrationer i assaybrøndene, så de kan bruges til standardkurven med følgende intervaller: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Den højeste koncentration af umærket 17β-østradiol (1 μM) bør fungere som indikator for ikke-specifik binding. Denne koncentration er angivet ved mærket "NSB" i tabel 4, selv om den også indgår i standardkurven.

Svag binder

28. En svag binder (norethynodrel (CAS 68-23-5) eller alternativt norethindron (CAS 68-22-4)) bør medtages for at påvise følsomheden af hvert forsøg og for at give mulighed for en vurdering af variabiliteten, når assayet udføres over længere tid. Otte opløsninger af den svage binder fremstilles i DMSO og assaybuffer med slutkoncentrationer i assaybrøndene som følger: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} og 10^{-9} M.

Ikke-binder

29. Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) bør anvendes som den negative kontrol (ikke-binder). Det giver sikkerhed for, at der med det udførte assay påvises testkemikalier, som ikke binder sig til hrERα. Otte opløsninger af ikke-binder fremstilles i DMSO og assaybuffer, med slutkoncentrationer i assaybrøndene som følger: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Di-n-butylphthalat (DBP, CAS 84-72-2) kan anvendes som en alternativ ikke-binder, men kun testet op til 10^{-4} M. Det er påvist, at den maksimale opløselighed af DBP i assayet er 10^{-4}M.

hrERα-koncentration

30. Den mængde receptor, som giver en specifik binding på 40 ± 10 %, bør anvendes (jf. punkt 12-13 i tillæg 3). hrERα-opløsningen bør fremstilles ved fortynding af den funktionelle hrERα i iskold assaybuffer, umiddelbart inden brug.

[^{3}H]-17β-østradiol

31. Slutkoncentrationen af [^{3}H]-17β-østradiol i assaybrøndene skal være 0,5 nM.

Testkemikalier

32. I første omgang er det nødvendigt at foretage en opløselighedstest for at fastslå opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie og for at afdække det passende koncentrationsområde, der skal anvendes, når testprotokollen udføres. Opløselighedsgrænsen for hvert testkemikalie skal indledningsvis bestemmes i opløsningsmidlet og herefter yderligere bekræftes under assaybetingelser. Den slutkoncentration, der testes i assayet, bør ikke overstige 1 mM. Områdebestemmelsen omfatter en kontrolkultur med opløsningsmiddel sammen med mindst otte log-seriefortyndinger, der begynder ved den maksimale acceptable koncentration (f.eks. 1 mM eller lavere, baseret på opløselighedsgrænsen), og idet der noteres tilstedeværelse af uklarhed eller bundfald (jf. også punkt 35 i tillæg 3). Når koncentrationsområdet for testningen er

▼M8

fastlagt, testes et testkemikalie ved anvendelse af otte log-koncentrationer med passende intervaller som defineret i den foregående test til bestemmelse af dosisinterval. Koncentrationer, som testes i det andet og tredje forsøg, bør yderligere tilpasses, hvis det er relevant, for om nødvendigt bedre at kunne karakterisere koncentration/respons-kurven.

33. Fortyndinger af testkemikaliet fremstilles i det relevante opløsningsmiddel (jf. punkt 25 i tillæg 3). Hvis den højeste koncentration af testkemikaliet hverken kan opløses i DMSO eller ethanol, og tilsætning af mere opløsningsmiddel vil medføre, at opløsningsmiddelkoncentrationen i slutrøret bliver større end den acceptable grænse, kan den højeste koncentration reduceres til den næste lavere koncentration. I så fald kan en supplerende koncentration tilsættes i den lave ende af koncentrationsserien. Andre koncentrationer i serien bør forblive uændrede.

34. Testkemikalieopløsningerne bør overvåges nøje, når de tilsættes til assaybrønden, da testkemikaliet kan danne bundfald ved tilsætning til assaybrønden. Data for alle brønde, der indeholder bundfald, bør udelukkes fra kurvetilpasningen, og årsagen til udelukkelsen af data noteres.

35. Hvis der allerede findes oplysninger fra andre kilder, som angiver en log (IC_{50}) for et testkemikalie, kan det være hensigtsmæssigt at sætte en tættere geometrisk afstand mellem fortyndingerne omkring den forventede log(IC_{50}) (dvs. 0,5 log-enheder). Slutresultaterne bør vise nok tilstrækkelig spredning af koncentrationer på begge side af log(IC_{50}), herunder "top" og "bund", således at bindingskurven kan karakteriseres tilstrækkeligt.

Organisering af assaypladen

36. Mærkede mikrotiterplader bør forberedes ved anvendelse af seksdobbelte inkubationer for kontrolkulturen med opløsningsmiddel, den højeste koncentration af referenceøstrogen (E2), der også fungerer som indikator for ikke-specifik binding (NSB), bufferkontrol, og tredobbelte inkubationer for hver af de otte koncentrationer af den ikke-bindende kontrol (octyltriethoxysilan), de syv lavere koncentrationer af referenceøstrogen (E2), de otte koncentrationer af den svage binder (norethynodrel eller norethindron) og de otte koncentrationer af hvert testkemikalie (TC). Et layouteksempel på pladelayoutdiagrammet til de fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller er anført nedenfor i tabel 4. Supplerende mikrotiterplader bruges til testkemikaliet og bør omfatte pladekontroller (dvs. i) en høj- (maksimal fortrængning) og middel- (ca. IC_{50}) koncentration af E2 og svag binder in triplo, ii) kontrolkultur med opløsningsmiddel (som total binding) og ikke-specifik binding, hver især seksdobbelt (tabel 5). Et eksempel på et arbejdsark for layout til en mikrotiterplade til et kompetitivt assay med tre ukendte testkemikalier er anført i tillæg 3.3. De koncentrationer, der er anført på arbejdsarket og i tabel 4 og 5, henviser til de slutkoncentrationer, som er anvendt i hver assaybrønd. Den maksimale koncentration for E2 bør være 1×10^{-7} M, og for den svage binder bør den højeste anvendte koncentration for den svage binder på plade 1 anvendes. IC_{50}-koncentrationen skal bestemmes af laboratoriet på grundlag af deres historiske kontroldatabase. Forventningen er, at denne værdi vil ligne den, der blev observeret i valideringsundersøgelserne (jf. tabel 1).

▼M8

Tabel 4

Layout for mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay (1) (2), fulde koncentrationskurver for referenceøstrogen og kontroller (plade 1).

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Bufferkontrol og positiv kontrol (E2)			Svagt positiv (norethynodrel)			Negativ kontrol (OTES)			TB og NSB		
A	Blindprøve (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrolkultur med opløsningsmiddel) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Bufferkontrol		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blindprøve (til varm) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Prøveopstilling for standardmikrotiterpladen, som skal benyttes ved hvert forsøg.
(2) Bemærk, at denne mikrotiterplade er lavet ved anvendelse af fortyndinger fremstillet på fortyndingspladen, som er beskrevet for standarderne i de foregående afsnit.
I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)
(*) reel blindprøve, brønd ikke benyttet
(**) blindprøve ikke benyttet under inkubationen, men brugt til at bekræfte den samlede tilsatte radioaktivitet.

Tabel 5

Layout til mikrotiterpladen til et kompetitivt bindingsassay, supplerende plader til testkemikalier (TC) og pladekontroller.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testkemikalie 1 (TC-1)			Testkemikalie 2(TC-2)			Testkemikalie 3(TC-3)			Kontroller		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrolkultur med opløsningsmiddel)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

I dette eksempel er den svage binder norethinodrel (NE)

▼M8

Gennemførelse af kompetitivt bindingsassay

37. Mens brønde til total binding og blindprøver (til varm) undtages som vist i tabel 6, sættes 50 µl assaybuffer i hver brønd og blandes med 10 µl af kontrolkulturen med opløsningsmiddel, referenceøstrogen (E2), svag binder, ikke-binder og testkemikalier, henholdsvis 10 µl af en 5 nM [3H]-17β-østradiolopløsning. Herefter blev der tilsat 30 µl iskold receptoropløsning til hver plade og blandet forsigtigt. hrERα-opløsningen bør være det sidste reagens, der tilsættes. Assaymikrotiterplader bør inkuberes ved stuetemperatur (22-28 °C) i to timer.

Tabel 6

Mængde af assaykomponenter til kompetitivt bindingsassay med hrER, mikrotiterplader

Fremstillingstrin		Andre end TB-brønde	TB-brønde	Blindprøve (til varm)
Komponentvolumen til reaktionsbrønde og tilsætningsrækkefølge	Assaybuffer ved stuetemperatur	50 µl	60 µl	90 µl
	Umærket E2, svag binder, ikke-binder, opløsningsmiddel og testkemikalier (*)	10 µl	–	–
	[3H]-17β-østradiol, der giver en slutkoncentration på 0,5 nM (dvs. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα-koncentration som fastlagt (jf. punkt 12-13)	30 µl	30 µl	–
Samlet mængde i hver assaybrønd		100 µl	100 µl	100 µl

(*) korrekt fremstillet, så der opnås en slutkoncentration inden for den acceptable opløsningsmiddelkoncentration.

38. Kvantificeringen af [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα efter separation af [^{3}H]-17β-østradiol bundet til hrERα fra fri [^{3}H]-17β-østradiol ved tilsætning af 100 µl iskold DCC-suspension til hver brønd bør herefter udføres som beskrevet i punkt 21-23 i tillæg 3 for mætningsbindingsassayet.

39. Brønd G10-12 og H10-12 (identificeret som blindprøve (til varm) i tabel 4) repræsenterer dpms i [^{3}H]-mærket østradiol i 10 µl. Delprøven på 10 µl hældes direkte i scintillationsvæsken.

Acceptkriterier

Mætningsbindingsassay

40. Den specifikke bindingskurve bør nå et plateau i takt med anvendelsen af stigende koncentrationer af [^{3}H]-17β-østradiol, hvilket viser mætningen af hrERα med ligand.

41. Den specifikke binding ved 0,5 nM [^{3}H]-17β-østradiol bør ligge inden for det acceptable område på 30-50 % af den gennemsnitlige målte samlede radioaktivitet, der tilsættes på tværs af analyseserier. Lejlighedsvise lette udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyseserie ligger væsentligt uden for dette område, bør proteinkoncentrationen justeres, og mætningsassayet gentages.

▼M8

42. Dataene bør generere et lineært Scatchard-plot.

43. Den ikke-specifikke binding bør ikke være uforholdsmæssigt stor. Værdien for den ikke-specifikke binding bør typisk være < 35 % af den totale binding. Forholdet kan dog undertiden overstige denne grænse ved måling af en meget lav dpm for den laveste testede koncentration af radioaktivt mærket 17β-østradiol.

Kompetitivt bindingsassay

44. Stigende koncentrationer af umærket 17β-østradiol bør fortrænge [^{3}H]-17β-østradiol fra receptoren på en måde, der stemmer overens med en kompetitiv binding ét sted.

45. IC_{50}-værdien for referenceøstrogenet (dvs. 17β-østradiol) bør omtrent svare til den molære koncentration af [^{3}H]-17β-østradiol plus den Kd, der er bestemt ud fra mætningsbindingsassayet.

46. Den totale specifikke binding bør til stadighed ligge inden for det acceptable område på 40 ± 10 %, når den gennemsnitlige målte koncentration af den samlede radioaktivitet tilsat til hver brønd var 0,5 nM på tværs af analyseserier. Lejlighedsvise lette udsving uden for dette område er acceptable, men hvis analyseserier konsekvent ligger uden for dette område, eller en særlig analyseserie ligger væsentligt uden for området, bør proteinkoncentrationen justeres.

47. Opløsningsmidlet bør ikke ændre assayets følsomhed eller reproducerbarhed. Resultaterne af kontrolkulturen med opløsningsmiddel (TB-brønde) sammenlignes med bufferkontrollen for at kontrollere, at det anvendte opløsningsmiddel ikke påvirker assaysystemet. Resultaterne af TB og bufferkontrol bør være sammenlignelige, hvis opløsningsmidlet ikke påvirker assayet.

48. Ikke-binderen bør ikke fortrænge mere end 25 % af [^{3}H]-17β-østradiol fra hrERα ved test op til 10^{-3} M (OTES) eller 10^{-4} M (DBP).

49. Der blev udviklet ydeevnekriterier for referenceøstrogen og to svage bindere (f.eks. norethynodrel, norethindron) ved hjælp af data fra valideringsundersøgelsen for CERI's hrER-bindingsassay (bilag N i reference 2). Der er anført 95 %-konfidensintervaller for den gennemsnitlige ± standardafvigelse (n) af alle kontrolanalyseserier på tværs af fire laboratorier, som deltog i valideringsundersøgelsen. Der blev beregnet 95 %-konfidensintervaller for de kurvetilpassede parametre (dvs. top, bund, Hills kurve og $logIC_{50}$) for referenceøstrogen og svage bindere og for log_{10}RBA af de svage bindere i forhold til referenceøstrogen. Tabel 1 viser forventede intervaller for kurvetilpassede parametre, der kan benyttes som ydeevnekriterier. I praksis kan området for IC_{50} variere lidt baseret på den eksperimentelt udledte Kd af receptorpræparatet og den ligandkoncentration, som blev anvendt til assayet.

50. Der blev ikke udviklet ydeevnekriterier for kurvetilpassede parametre for testkemikalier på grund af den brede vifte af eksisterende potentielle testkemikalier og variation i potentielle affiniteter og udfald (f.eks. fuld kurve, delkurve, ingen kurvetilpasning). Der bør dog anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyseserie for et testkemikalie. Der skal benyttes et tilstrækkeligt koncentrationsområde for testkemikaliet for

▼M8

klart at definere toppen (f.eks. 90-100 % af bindingen) af den kompetitive kurve. Variabiliteten mellem replikater ved hver koncentration af testkemikaliet samt mellem de tre ikke-sideløbende analyseserier skal være rimelig og videnskabeligt forsvarlig. Kontroller fra hver analyseserie for et testkemikalie skal tilnærmes resultatmålinger rapporteret for dette CERI-assay og skal stemme overens med tidligere kontroldata fra de respektive laboratorier.

ANALYSE AF DATA

Mætningsbindingsassay

51. Der måles både samlet og ikke-specifik binding. På grundlag af disse værdier beregnes specifik binding af stigende koncentrationer af [^{3}H]-17β-østradiol under ligevægtsbetingelser ved fratrækning af ikke-specifik binding fra samlet binding. En graf over specifik binding i forhold til [^{3}H]-17β-østradiolkoncentration bør nå et plateau for maksimal specifik binding som tegn på mætning af hrERα med [^{3}H]-17β-østradiol. Endvidere bør analyse af data dokumentere bindingen af [^{3}H]-17β-østradiol til et enkelt bindingssted med høj affinitet. Ikke-specifik, samlet og specifik binding bør vises på en mætningsbindingskurve. Ved yderligere analyse af disse data bør der benyttes en ikke-lineær regressionsanalyse (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995) med en endelig visning af data som et Scatchard-plot.

52. Dataanalysen skal bestemme Bmax og Kd på grundlag af de totale bindingsdata alene ud fra den antagelse, at ikke-specifik binding er lineær, medmindre der gives en begrundelse for at benytte en anden metode. Der bør desuden benyttes en robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Der bør altid korrigeres for liganddepletering (f.eks. ved hjælp af Swillens metode, 1995) ved bestemmelse af Bmax og Kd ud fra mætningsbindingsdata.

Kompetitivt bindingsassay

53. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^{3}H]-17β-østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log10-enheder). Den koncentration af testkemikaliet, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^{3}H]-17β-østradiolbinding, er IC_{50}-værdien.

54. Skøn over log(IC_{50})-værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre (f.eks. BioSoft, McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Top, bund, hældning og log(IC_{50}) skal normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Der bør ikke korrigeres for liganddepletion. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder beregnes som en procentdel af log (IC_{50}) for den svage binder i forhold til log (IC_{50}) for 17β-østradiol. Resultaterne fra de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved hjælp af målinger af assayets ydeevne i punkt 44-49 i dette tillæg 3.

▼M8

55. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Det anbefales, at hver analyseserie for et testkemikalie indledningsvis gennemgår en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder (jf. punkt 54 i dette tillæg 3). Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvise specifikt bundne [^{3}H]-17β-østradiol, lav variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver testkemikaliekoncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev behørigt gennemført.

Fortolkning af data

56. Forudsat at alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en binder for hrERα, hvis der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er under 50 % (figur 1).

57. Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være en ikke-binder for hrERα, hvis:

— der kan tilpasses en bindingskurve, og det laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet ligger over 75 %, eller

— der ikke kan tilpasses en bindingskurve, og den laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene ligger over 75 %.

58. Testkemikalierne anses for usikre, hvis ingen af de ovennævnte betingelser er opfyldt (f.eks. det laveste punkt på den tilpassede responskurve ligger mellem 76 og 51 %).

Tabel 7

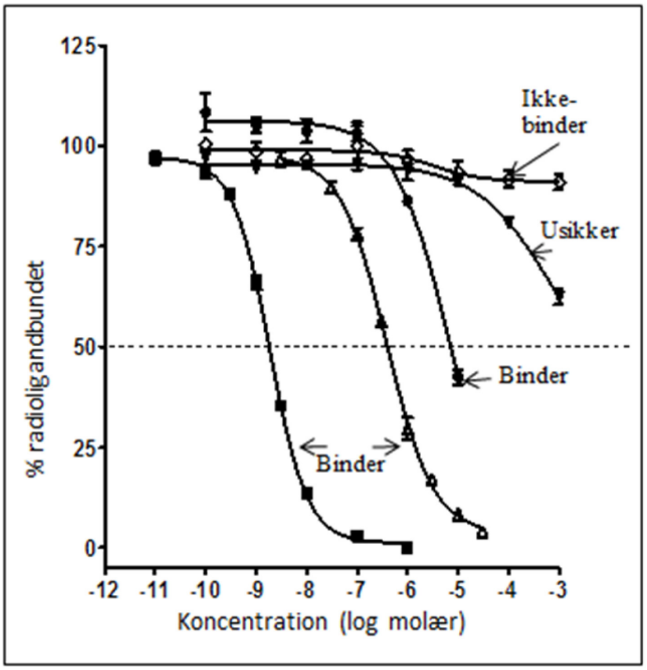
Kriterier for klassificering på grundlag af et testkemikalies kompetitive bindingskurve

Klassificering	Kriterier
Binder[a]	En bindingskurve kan tilpasses. Det **laveste punkt på responskurven inden for dataområdet er mindre end 50 %.**
Ikke-binder[b]	Hvis en bindingskurve kan tilpasses, er det **laveste punkt på den tilpassede responskurve inden for dataområdet over 75 %.** Hvis en bindingskurve ikke kan tilpasses, er den **laveste ikke-udjævnede, gennemsnitlige, procentvise binding blandt koncentrationsgrupperne i dataene over 75 %.**
Usikker[c]	Enhver testbar analyseserie, som hverken er en binder eller en ikke-binder (*f.eks.* Det laveste punkt på den tilpassede responskurve er mellem 76 % og 51 %).

▼M8

Figur 1

Eksempler på klassificering af testkemikalier ved anvendelse af kompetitiv bindingskurve.



59. Flere analyseserier for et testkemikalie, der gennemføres i et laboratorium, kombineres ved at tildele hver analyseserie en numerisk værdi og beregne gennemsnittet på tværs af analyseserierne som vist i tabel 8. Resultater for de kombinerede analyseserier i hvert laboratorium sammenlignes med den forventede klassificering for hvert testkemikalie.

Tabel 8

Metode til klassificering af testkemikalier ved anvendelse af flere analyseserier i et laboratorium

Tildeling af værdi til hver analyseserie:	
Klassificering	**Numerisk værdi**
Binder	2
Usikker	1
Ikke-binder	0
Klassificering af gennemsnitlig numerisk værdi på tværs af analyseserier:	
Klassificering	**Numerisk værdi**
Binder	Gennemsnit ≥ 1,5
Usikker	0,5 ≤ Gennemsnit < 1,5
Ikke-binder	Gennemsnit < 0,5

TESTRAPPORT

60. Jf. punkt 24 i "hrER-BINDINGSASSAYETS KOMPONENTER" i denne forsøgsmetode.

▼**M8**

Tillæg 3.1

TERMINOLOGI

[^{3}H]E2: 17β-østradiol radioaktivt mærket med tritium

DCC: dextranovertrukket trækul

E_2: umærket 17β-østradiol (inert)

Assaybuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, indeholdende 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, 1 mM dithiothreitol og 10 mg/ml bovint serumalbumin

hrERα: human rekombinant østrogenreceptor alfa (ligandbindingsområde)

Replikat: en af flere brønde, der har samme indhold ved de samme koncentrationer, og som analyseres sideløbende inden for én analyseserie. I denne protokol testes hver koncentration af testkemikaliet in triplo, dvs. at der er tre replikater, som analyseres samtidig ved hver koncentration af testkemikaliet.

Analyseserie: et fuldstændigt sæt assaybrønde på mikrotiterplade, der kører sideløbende, og som giver alle nødvendige oplysninger til at karakterisere bindingen af et testkemikalie til hrERα (nemlig samlet [^{3}H]-17β-østradiol tilsat til assaybrønden, maksimal binding af [^{3}H]-17β-østradiol til hrERα, ikke-specifik binding og total binding ved forskellige koncentrationer af testkemikaliet). En analyseserie kan bestå af så lidt som én assaybrønd (dvs. replikat) pr. koncentration, men eftersom denne protokol kræver tredobbelt analyse, består én analyseserie af tre assaybrønde pr. koncentration. Endvidere kræver denne protokol tre uafhængige (dvs. ikke-sideløbende) analyseserier pr. kemikalie.

▼**M8**

Tillæg 3.2

KOMPETITIVT BINDINGSASSAY: BRØNDLAYOUT

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	A1	1	Blindprøve	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blindprøve	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blindprøve	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	kold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	kold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	kold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	kold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	kold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

▼M8

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	G2	2	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	kold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	kold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	F4	1	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	H4	1	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DB-P7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	kold E2 (høj)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	kold E2 (høj)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	kold E2 (høj)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	kold E2 (høj)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	kold E2 (høj)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	D12	6	kold E2 (høj)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Bufferkontrol	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Bufferkontrol	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Bufferkontrol	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Bufferkontrol	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Bufferkontrol	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Bufferkontrol	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10 (*)	1	Blindprøve (til varm)	Varm	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11 (*)	2	Blindprøve (til varm)	Varm	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12 (*)	3	Blindprøve (til varm)	Varm	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10 (*)	4	Blindprøve (til varm)	Varm	H4	-	90	-	10	-	100	-

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
S	H11 (*)	5	Blindprøve (til varm)	Varm	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blindprøve (til varm)	Varm	H6	-	90	-	10	-	100	-
P1	A1	1	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Ukendt 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Ukendt 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Ukendt 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Ukendt 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Ukendt 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Ukendt 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Ukendt 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
P1	H3	3	Ukendt 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Ukendt 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Ukendt 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Ukendt 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Ukendt 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Ukendt 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Ukendt 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Ukendt 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Ukendt 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
P1	A9	3	Ukendt 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Ukendt 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Ukendt 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Ukendt 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Ukendt 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Ukendt 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Ukendt 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Ukendt 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Kontrol E2 (maks.)	S	E2maks1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Kontrol E2 (maks.)	S	E2maks2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Kontrol E2 (maks.)	S	E2maks3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
P1	B11	2	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrol E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrol NE (maks.)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Kontrol NE (maks.)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Kontrol NE (maks.)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Kontrol NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrol NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrol NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	kold E2 (høj)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	kold E2 (høj)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	kold E2 (høj)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	kold E2 (høj)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	kold E2 (høj)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	kold E2 (høj)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-

▼**M8**

Plade	Placering	Replikat	Brøndtype	Brøndkode	Koncentrations-kode	Konkurrent Begyndelses koncentration (M)	hrER-stamkultur (µl)	Buffervolumen (µl)	Sporstof (varm E2) Volumen (µl)	Volumen fra fortyndingsplade (µl)	Slutvolumen (µl)	Konkurrent Slutkon centration (M)
P1	H10	4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

(*) Bemærk, at de "varme" brønde er tomme under inkubation. De 10 µl tilsættes kun til scintillationstælling.

▼**M8**

Tillæg 4

OVERVEJELSER OVER ANALYSEN AF DATA FRA DET KOMPETITIVE HRER-BINDINGSASSAY

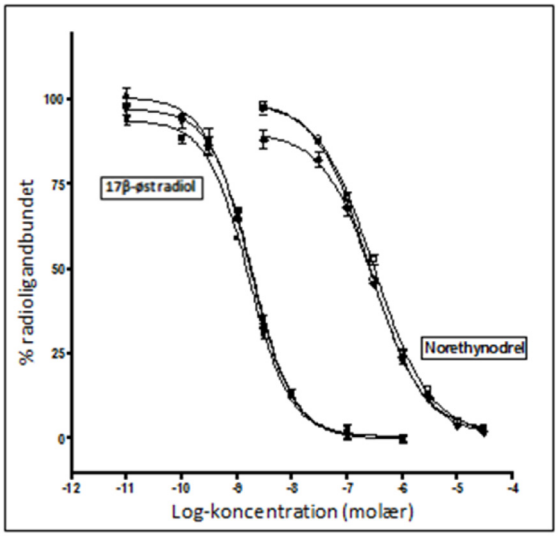
1. Det kompetitive hrERα-bindingsassay måler bindingen af en enkelt koncentration af [^{3}H]-17β-østradiol under tilstedeværelse af stigende koncentrationer af et testkemikalie. Den kompetitive bindingskurve plottes som specifik [^{3}H]-17β-østradiolbinding mod konkurrentens koncentration (log10-enheder). Den koncentration af testkemikaliet, der inhiberer 50 % af den maksimale specifikke [^{3}H]-17β-østradiolbinding, er IC_{50}.

Dataanalyse for referenceøstrogen og svag binder (1)

2. Data fra kontrolanalyseserierne omdannes (dvs. procent [^{3}H]-17β-østradiol-specifik binding og log-koncentrationen af kontrolkemikaliet) til videre analyse. Skøn over log(IC_{50})-værdier for de positive kontroller (f.eks. referenceøstrogen og svag binder) bestemmes ved anvendelse af en passende ikke-lineær kurvetilpasningssoftware, som passer til en Hill-ligning med fire parametre (f.eks. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Top, bund, hældning og log(IC_{50}) kan normalt være frie ved tilpasning af disse kurver. Der bør benyttes robust regression ved bestemmelse af den bedste tilpasning, medmindre der gives en begrundelse. Den valgte metode til robust regression skal anføres. Det var ikke nødvendigt at korrigere for liganddepletering for FW- eller CERI's hrER-assays, men kan om nødvendigt overvejes. Efter den indledende analyse skal hver bindingskurve revideres for at sikre, at den passer til modellen. Den relative affinitet (RBA) for den svage binder kan beregnes som en procentdel af log (IC_{50}) for den svage binder i forhold til log (IC_{50}) for 17β-østradiol. Resultater for de positive kontroller og ikke-binderkontrollen bør vurderes ved anvendelse af mål for assayets ydeevne og acceptkriterier som beskrevet i denne forsøgsmetode (punkt 20), tillæg 2 (FW-assay, punkt 41-51) og tillæg 3 (CERI-assay, punkt 41-51). Eksempler på tre analyseserier for referenceøstrogen og svag binder er vist i figur 1.

Figur 1

Eksempler på de kompetitive bindingskurver for referenceøstrogen og den svage binder, der fungerer som kontrol



▼M8

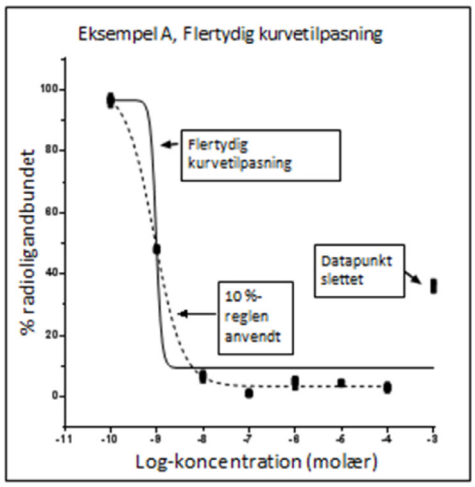
Dataanalyse for testkemikalier

3. Data for alle testkemikalier analyseres gennem en trinvis tilgang for at sikre, at dataene analyseres indgående, og at hver kompetitiv bindingskurve klassificeres korrekt. Hver analyseserie for et testkemikalie bør indledningsvis gennemgå en standardiseret dataanalyse, som er identisk med den, der benyttes for referenceøstrogen og kontroller for svag binder. Når analysen er færdig, foretages en teknisk gennemgang af kurvetilpasningsparametrene samt en visuel gennemgang af, hvor godt dataene passer til den genererede kompetitive bindingskurve for hver analyseserie. Under denne tekniske gennemgang er observationer af et koncentrationsafhængigt fald i den procentvise specifikt bundne [^{3}H]-17β-østradiol, lav variabilitet mellem de tekniske replikater ved hver kemisk koncentration og konsistens i tilpassede parametre mellem de tre analyseserier et godt tegn på, at assayet og dataanalyserne blev gennemført korrekt. Der bør anlægges en faglig vurdering ved gennemgang af resultater fra hver analyseserie for et testkemikalie, og de data, der benyttes til at klassificere hvert testkemikalie som binder eller ikke-binder skal være videnskabeligt forsvarlige.

4. Undertiden kan der være eksempler på data, som kræver supplerende opmærksomhed med henblik på at analysere og fortolke hrER-bindingsdataene korrekt. Tidligere undersøgelser havde vist tilfælde, hvor det kan være kompliceret at analysere og fortolke kompetitive receptorbindingsdata på grund af en stigning i den procentvise specifikke binding, ved testning af kemikalier ved de højeste koncentrationer (figur 2). Dette er et velkendt problem, som man er stødt på ved anvendelse af protokoller til en række kompetitive receptorbindingsassays (3). I disse tilfælde observeres en koncentrationsafhængig respons ved lavere koncentrationer, men i takt med at koncentrationen af testkemikaliet nærmer sig opløselighedsgrænsen, falder fortrængningen af [^{3}H]17β-østradiol ikke længere. I disse tilfælde viser data for de højere koncentrationer, at assayets biologiske grænse er nået. F.eks. forbindes dette fænomen mange gange med kemisk uopløselighed og bundfald ved høje koncentrationer eller kan også afspejle overskridelse af det dextranovertrukne trækuls kapacitet til at fange ubundet radioaktivt mærket ligand under adskillelsesproceduren ved de højeste kemiske koncentrationer. Hvis sådanne datapunkter ignoreres, når data om kompetitiv binding tilpasses en sigmoidal kurve, kan det undertiden føre til en forkert klassificering af et testkemikalies ER-bindingspotentiale (figur 2). For at undgå dette omfatter protokollen for FW- og CERI-hrER-bindingsassays en mulighed for at se bort fra datapunkter i de analyser, hvor replikatgennemsnittet af den procentvise specifikt bundne [^{3}H]17β-østradiol ligger 10 % eller mere over den gennemsnitsværdi, som blev observeret ved en lavere koncentration (dvs. dette omtales almindeligvis som 10 %-reglen). Denne regel kan kun benyttes én gang for en given kurve, og der skal være data tilbage for mindst seks koncentrationer, således at kurven kan klassificeres korrekt.

Figur 2

Eksempler, kompetitive bindingskurver med og uden anvendelse af 10 %-reglen

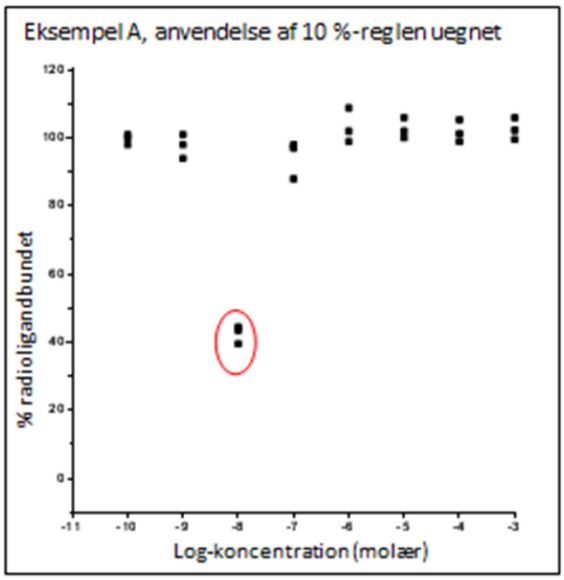


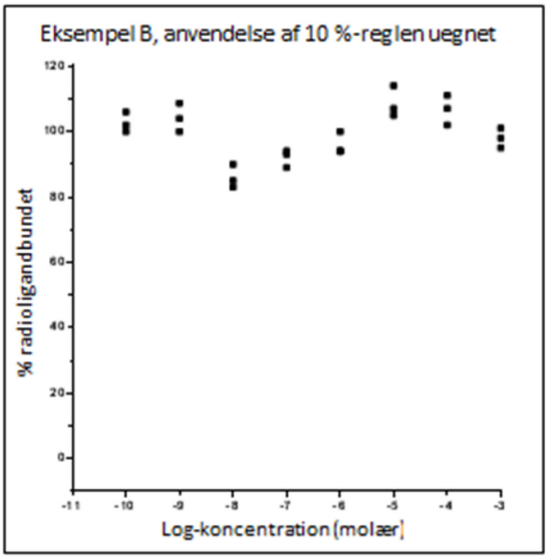
▼**M8**

5. Passende anvendelse af 10 %-reglen til at korrigere disse kurver bør nøje overvejes og forbeholdes de tilfælde, hvor der er stærk indikation for en hrER-binder. Under udførelsen af forsøg til valideringsundersøgelsen af FW-hrER-bindingsassayet blev det observeret, at 10 %-reglen undertiden havde en utilsigtet og uforudset konsekvens. Kemikalier, som ikke interagerede med receptoren (dvs. reelle ikke-bindere), udviste ofte variabilitet omkring 100 % radioligandbinding, som var større end 10 % på tværs af det testede koncentrationsområde. Hvis den laveste værdi skulle være ved en lav koncentration, kan dataene fra alle højere koncentrationer potentielt slettes fra analysen ved anvendelse af 10 %-reglen, selv om disse koncentrationer kunne være nyttige til at fastslå, at kemikaliet er en ikke-binder. Figur 3 viser eksempler, hvor anvendelsen af 10 %-reglen ikke er hensigtsmæssig

Figur 3

Eksempler, data om kompetitiv binding, hvor anvendelsen af 10 %-reglen ikke er hensigtsmæssig





▼**M8**

Henvisninger

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. og Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. *IN VITRO* HUDSENSIBILISERINGSASSAYS AF DEN CENTRALE BEGIVENHED AKTIVERING AF DENDRITISKE CELLER I ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FOR HUDSENSIBILISERING

GENEREL INDLEDNING

Forsøgsmetode baseret på den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler

1. Et hudsensibiliserende stof er et stof, der inducerer en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU) forordning nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ([1]). Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, der ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i en Adverse Outcome Pathway (AOP) under OECD's AOP-program (2) fra den molekylære udløsende begivenhed over de mellemliggende begivenheder til den skadelige virkning, nemlig allergisk kontaktdermatitis. I dette tilfælde er den molekylære udløsende begivenhed (dvs. den første centrale begivenhed) den kovalente binding af elektrofile stoffer til nukleofile centre i hudproteiner. Den anden centrale begivenhed i denne AOP finder sted i keratinocytterne og omfatter inflammatoriske reaktioner samt ændringer i genekspression i tilknytning til specifikke cellesignalveje, f.eks. antioxidant-/elektrofilresponselement (ARE)- afhængige veje. Den tredje centrale begivenhed er aktivering af dendritiske celler, som typisk vurderes ved ekspression af bestemte celleoverflademarkører, kemokiner og cytokiner. Den fjerde centrale begivenhed er T-celleaktivering, som vurderes indirekte ved Local Lymph Node Assay (assay på lokale lymfeknuder – LLNA) i mus (3).

2. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 442E (2017). Heri beskrives in vitro-assays vedrørende de mekanismer, der er beskrevet under den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler i hudsensibiliserings-AOP'en (2). Denne forsøgsmetode omfatter test, der anvendes til at underbygge differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer i henhold til UN GHS og CLP.

   De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, er:

   — Human Cell Line Activation-test (h-CLAT)

   — U937 cell line activation-test (U-SENS™)

   — Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay).

3. De test, der indgår i denne forsøgsmetode og den tilsvarende OECD-testvejledning, kan afvige fra den fremgangsmåde, der anvendes til generering af data, og de målte resultater, men de kan anvendes uden forskel til at opfylde landenes behov for testresultater vedrørende den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler i hudsensibiliserings-AOP'en, samtidig med at de drager fordel af OECD-aftalen om gensidig godkendelse af data.

([1]) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008.

▼M8

Baggrund og principper for de test, der indgår i forsøgsmetoden baseret på den centrale begivenhed

4. Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder, der anvender marsvin, Magnusson og Kligmans Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (4)) vurderer man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. Musetest, LLNA (TM B.42) (3) og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (5)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) vurderer alle udelukkende induktionsresponsen og er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvineforsøg, hvad angår dyrevelfærd og en objektiv måling af latenstiden for hudsensibilisering.

5. På det seneste er der blevet indført mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder vedrørende den første centrale begivenhed (TM B.59; direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA) (7)) og den anden centrale begivenhed (TM B.60;ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden (8)) i hudsensibiliserings-AOP'en som et bidrag til evalueringen af kemikaliers potentielle hudsensibiliseringsfare.

6. De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, måler enten ændringen i ekspressionen af celleoverflademarkør(er), der er knyttet til processen med aktivering af monocyter og dendritiske celler efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (f.eks. CD54, CD86), eller ændringer i ekspressionen af IL-8, et cytokin knyttet til aktiveringen af dendritiske celler. Hudsensibiliserende stoffer inducerer angiveligt ekspression af cellemembranmarkører som f.eks. CD40, CD54, CD80, CD83 og CD86 og inducerer desuden proinflammatoriske cytokiner som f.eks. IL-1β og TNF-α og adskillige kemokiner, herunder IL-8 (CXCL8) og CCL3 (9) (10) (11) (12), knyttet til aktivering af dendritiske celler (2).

7. Da aktivering af dendritiske celler imidlertid kun udgør en central begivenhed i hudsensibiliserings-AOP'en (2) (13), er den information, der genereres med test, som måler markører for aktivering af dendritiske celler alene, muligvis ikke tilstrækkelig til at drage konklusioner om, hvorvidt kemiske stoffer har et hudsensibiliseringspotentiale eller ej. Derfor skal de data, der genereres med de test, som er beskrevet i denne forsøgsmetode, støtte differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer, når de anvendes i en integreret tilgang til testning og vurdering (IATA) sammen med andre relevante supplerende oplysninger fra f.eks. in vitro-assays, der vedrører andre centrale begivenheder i hudsensibiliserings-AOP'en, samt andre metoder end test, herunder analogislutning fra tilsvarende kemikalier (13). Eksempler på anvendelse af data genereret med disse test i definerede tilgange, dvs. tilgange, som er standardiserede både i forhold til den række af informationskilder, der anvendes, og i forhold til den procedure, der anvendes på dataene med henblik på at udlede prognoser, er blevet offentliggjort (13) og kan anvendes som nyttige elementer i IATA.

8. De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategorierne 1A og 1B som defineret i UN GHS-/CLP, af myndigheder, der anvender disse to valgfrie underkategorier, eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af den juridiske ramme kan de positive udfald, som disse metoder genererer, imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS-/CLP-kategori 1.

▼M8

9. Betegnelsen »testkemikalie« anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes ([1]), og vedrører ikke anvendeligheden af test til testning af stoffer med én bestanddel, stoffer med flere bestanddele og/eller blandinger. I øjeblikket foreligger der begrænsede oplysninger om anvendeligheden af test på stoffer med flere bestanddele/blandinger (14) (15). Testene kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til stoffer med flere bestanddele og blandinger. Før denne forsøgsmetode anvendes til test af en blanding til generering af data med et lovmæssigt formål, bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor ([2]). Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om testning af blandingen. Ved test af stoffer med flere bestanddele eller blandinger bør der desuden tages hensyn til cytotoksiske bestanddeles eventuelle interferens med de observerede responser.

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (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 Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Kapitel B.42 i dette bilag: Assay på lokale lymfeknuder.

(4) Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.

(5) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.

(6) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: BrdU-ELISA.

(7) Kapitel B.59 i dette bilag: In chemico-hudsensibilisering: direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA).

(8) Kapitel B.60 i dette bilag: In vitro-hudsensibilisering: ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL og Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H og Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) I juni 2013 blev OECD på et fælles møde enig om, at termen »testkemikalie«, hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede OECD-testvejledninger til at beskrive det, der testes.

([2]) Denne sætning blev foreslået og godkendt på WNT-mødet i april 2014.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y og Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing and 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. Tilgængelig på: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Tillæg 1

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST (H-CLAT)

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. h-CLAT måler ændringer i ekspressionen af celleoverflademarkører i tilknytning til processen med aktivering af monocyter og dendritiske celler (DC) (dvs. CD86 og CD54) i human monocytisk leukæmi-cellelinjen THP-1 efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (1) (2). De målte ekspressionsniveauer for celleoverflademarkørerne CD86 og CD54 anvendes dernæst til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

2. h-CLAT er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse koordineret af Den Europæiske Unions Referencelaboratorium for Alternativer til Dyreforsøg (EURL ECVAM), og EURL ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) foretog efterfølgende uafhængige peer reviews. På grundlag af al tilgængelig dokumentation og input fra myndigheder og interessenter anbefalede EURL ECVAM (3), at h-CLAT anvendes som en del af en IATA til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Litteraturen indeholder eksempler på anvendelse af h-CLAT-data i kombination med andre oplysninger (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Det viste sig, at h-CLAT kunne overføres til laboratorier med erfaring inden for celledyrkningsteknikker og flowcytometrianalyse. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra testen, ligger i størrelsesordenen 80 % inden for og mellem laboratorier (3) (12). De resultater, der er blevet genereret i valideringsundersøgelsen (13) og andre offentliggjorte undersøgelser (14), indikerer generelt, at nøjagtigheden af differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer i forhold til LLNA-resultaterne er 85 % (N=142) med en følsomhed på 93 % (94/101) og en specificitet på 66 % (27/41) (baseret på en ny analyse foretaget af EURL ECVAM (12), hvor alle de eksisterende data er blevet taget i betragtning, og der ikke er blevet taget hensyn til de negative resultater for kemikalier med en log Kow på mere end 3,5 som beskrevet i punkt 4). Det er mere sandsynligt, at falsk negative forudsigelser i forbindelse med h-CLAT vil vedrøre kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP - underkategori 1B) end kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (4) (13) (15). Samlet set viser denne information nytteværdien af h-CLAT som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfarer. De nøjagtige værdier, der her angives for h-CLAT som en selvstændig test, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-forsøg samt andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

4. På grundlag af de data, der er tilgængelige i øjeblikket, har h-CLAT vist sig at være relevant for testkemikalier, der omfatter en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrker (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (3) (14) (15). h-CLAT-metoden kan anvendes til at teste kemikalier, der er opløselige, eller som danner en stabil dispergering (dvs. en kolloid opløsning eller en suspension, i hvilken testkemikaliet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet/bærestoffet i forskellige faser) i et passende opløsningsmiddel/bærestof (jf. punkt 14). Testkemikalier med en log Kow på over 3,5 har tendens til at give falsk negative resultater (14). Der bør derfor ikke tages hensyn til negative resultater i forbindelse med testkemikalier med en log Kow på over 3,5. De positive resultater, der opnås med testkemikalier med

▼M8

en log Kow på over 3,5, kan imidlertid fortsat anvendes til støtte for påvisningen af testkemikaliet som et hudsensibiliserende stof. På grund af den anvendte cellelinjes begrænsede metaboliske kapacitet (16) og på grund af testbetingelserne kan pro-haptener (dvs. stoffer, der kræver enzymatisk aktivering f.eks. via P450-enzymer) og præ-haptener (dvs. stoffer, der aktiveres ved oxidering), især med en langsom oxideringsrate, også give negative resultater i h-CLAT (15). Fluorescerende testkemikalier kan vurderes ved hjælp af h-CLAT (17), men stærkt fluorescerende stoffer, der udsender den samme bølgelængde som fluoresceinisothiocyanat (FITC) eller propidiumiodid (PI), vil interferere med den flowcytometriske detektion og kan derfor ikke evalueres korrekt ved hjælp af FITC-konjugerede antistoffer eller PI. I sådanne tilfælde kan henholdsvis andre flourochrom-mærkede antistoffer eller andre cytotoksicitetsmarkører anvendes, når blot det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-mærkede antistoffer (jf. punkt 24) eller PI (jf. punkt 18) f.eks. via testning af kompetencestofferne i tillæg 1-2. I lyset af ovenstående bør negative resultater fortolkes i lyset af de anførte begrænsninger og sammen med andre informationskilder inden for rammerne af IATA. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at h-CLAT-metoden ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.

5. Som beskrevet ovenfor understøtter h-CLAT differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Den kan imidlertid også potentielt bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (4) (5) (9), når den bruges i integrerede tilgange såsom IATA. Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, for at fastslå, hvordan h-CLAT-resultaterne eventuelt kan anvendes til styrkevurderingen.

6. Definitioner findes i tillæg 1.1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. h-CLAT-metoden er et in vitro-assay, der måler ændringerne af ekspressionen af celleoverflademarkører (dvs. CD86 og CD54) på en human monocytisk leukæmi-cellelinje, THP-1 celler, efter 24 timers eksponering for testkemikaliet. Disse overflademolekyler er typiske markører for monocytisk THP-1-aktivering og kan efterligne aktivering af dendritiske celler, der spiller en afgørende rolle i priming af T-celler. Ændringerne i ekspressionen af overflademarkører måles ved hjælp af flowcytometri efter cellefarvning med flourochrom-mærkede antistoffer. Der foretages en samtidig cytotoksicitetsmåling med henblik på at måle, om der forekommer øget ekspression af overflademarkører ved subcytotoksiske koncentrationer. Overflademarkørernes relative fluorescerende intensitet sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af forudsigelsesmodellen (jf. punkt 26) til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

8. Før rutinemæssig brug af den test, der beskrives i dette tillæg til forsøgsmetoden B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de ti kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 11) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 20-22), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

▼M8

FREMGANGSMÅDE

9. Denne forsøgsmetode er baseret på h-CLAT databasetjenesten om alternative metoder til dyreforsøg (DB-ALM), protokol nr. 158 (18), som repræsenterer den protokol, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen koordineret af EURL ECVAM. Det anbefales, at denne protokol anvendes ved gennemførelsen og anvendelsen af h-CLAT-metoden i laboratoriet. Følgende er en beskrivelse af h-CLAT-metodens vigtigste komponenter og procedurer, der består af to trin: *dosisbestemmelsesassay* og *CD86/CD54-ekspressionsmåling*.

Præparering af celler

10. Human monocytisk leukæmi-cellelinjen, THP-1, bør anvendes til udførelse af h-CLAT-metoden. Det anbefales, at celler (TIB-202™) anskaffes fra en velrenommeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection.

11. THP-1 celler dyrkes i en fugtig atmosfære ved 37°C og 5 % CO_2 og i RPMI-1640 medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 0,05 mM 2-mercaptoethanol, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Anvendelse af penicillin og streptomycin i dyrkningsmediet kan undgås. I sådanne tilfælde bør brugerne imidlertid kontrollere, at fraværet af antibiotika i dyrkningsmediet ikke indvirker på resultaterne, f.eks. ved at teste de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. For at minimere risikoen for kontaminering bør god celledyrkningspraksis under alle omstændigheder følges, uanset om der er antibiotika i celledyrkningsmediet eller ej. THP-1 celler podes rutinemæssigt hver 2. eller 3. dag ved en celletæthed på 0,1 til 0,2 × 10^6 celler/ml. De bør opretholdes ved celletætheder fra 0,1 til 1,0 × 10^6 celler/ml. Inden cellerne anvendes til testning, bør de valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Reaktivitetskontrollen af cellerne bør udføres ved hjælp af de positive kontroller, 2,4-dinitrochlorbenzen (DNCB) (CAS nr. 97-00-7, ≥ 99 % renhed) og nikkelsulfat ($NiSO_4$) (CAS nr. 10101-97-0, ≥ 99 % renhed), og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CAS nr. 50-21-5, ≥ 85 % renhed), to uger efter optøning. Både DNCB og $NiSO_4$ bør give en positiv respons for såvel CD86- som CD54-celleoverflademarkører, og LA bør give en negativ respons for såvel CD86- som CD54-celleoverflademarkører. Kun celler, der bestod reaktivitetskontrollen, bør anvendes til assayet. Cellerne kan opformeres i op til to måneder efter optøning. Der bør højst være 30 opformeringer. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 20-24.

12. Til testning podes THP-1-cellerne ved en celletæthed på enten 0,1 × 10^6 celler/ml eller 0,2 × 10^6 celler/ml, og de forkultiveres i dyrkningsflasker i henholdsvis 72 timer eller 48 timer. Det er vigtigt, at celletætheden i dyrkningsflasken lige efter forkultiveringsperioden er så stabil som muligt i hvert enkelt eksperiment (ved at anvende en af de to ovennævnte forkultiveringsmetoder), fordi celletætheden i dyrkningsflasken lige efter forkultiveringen vil kunne påvirke ekspressionen af CD86/CD54, der induceres af allergener (19). På dagen for testningen genopslæmmes de celler, der høstes fra dyrkningsflasken, i et nyt dyrkningsmedium med en celletæthed på 2 × 10^6 celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet 24-brønds plade (500 µl, 1 × 10^6 celler/brønd) eller en fladbundet 96-brønds plade (80 µl, 1,6 × 10^5 celler/brønd).

Dosisbestemmelsesassay

13. Der udføres et *dosisbestemmelseassay* for at fastlægge CV75, som er den koncentration af testkemikaliet, der resulterer i 75 % cellelevedygtighed (CV) sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen. CV75-værdien anvendes til at fastlægge koncentrationen af testkemikalierne til *CD86/CD54*-ekspressionsmålingen (jf. punkt 20-24).

▼**M8**

Fremstilling af testkemikalier og kontrolstoffer

14. Testkemikalierne og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. I h-CLAT-metoden opløses testkemikalierne, eller de dispergeres stabilt (jf. også punkt 4) i fysiologisk saltopløsning eller medium som første opløsningsmiddel-/bærestofmulighed eller dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % renhed) som anden opløsningsmiddel-/bærestofmulighed, hvis testkemikaliet ikke er opløseligt eller ikke danner en stabil dispersion i de to førstnævnte opløsningsmidler/bærestoffer, til slutkoncentrationer på 100 mg/ml (i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO). Andre opløsningsmidler/bærestoffer end de ovenfor beskrevne kan anvendes, hvis der er videnskabeligt belæg herfor. Der bør tages hensyn til testkemikaliets stabilitet i det endelige opløsningsmiddel/bærestof.

15. Begyndende med 100 mg/ml (i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO) stamopløsninger af testkemikalierne foretages følgende fortyndinger:

— fysiologisk saltopløsning eller medium som opløsningsmiddel/bærestof: Der fremstilles otte stamopløsninger (otte koncentrationer) ved hjælp af tofoldsseriefortyndinger, idet det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof anvendes. Disse stamopløsninger fortyndes derefter igen 50-fold i dyrkningsmediet (arbejdsopløsninger). Hvis den højeste slutkoncentration på pladen på 1 000 μg/ml er ikke-toksisk, bør maksimumskoncentrationen fastsættes igen ved at udføre en ny cytotoksicitetstest. Slutkoncentrationen på pladen bør ikke være højere end 5 000 μg/ml for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i en fysiologisk saltopløsning eller et medium.

— DMSO som opløsningsmiddel/bærestof: Der fremstilles otte stamopløsninger (otte koncentrationer) ved hjælp af tofoldsseriefortyndinger, idet det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof anvendes. Disse stamopløsninger fortyndes yderligere 250-fold i dyrkningsmediet (arbejdsopløsninger). Slutkoncentrationen på pladen bør ikke være højere end 1 000 μg/ml, selv om denne koncentration er ikke-toksisk.

Arbejdsopløsningerne anvendes til slut til eksponering ved at tilsætte en mængde af arbejdsopløsningen svarende til mængden af THP-1 cellesuspension i pladen (jf. også punkt 17) for at opnå en yderligere tofoldsfortynding (normalt er den endelige koncentrationsserie i pladen 7,81–1 000 μg/ml).

16. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, der anvendes i h-CLAT-metoden, er dyrkningsmedium (testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret (jf. punkt 4) enten i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller DMSO (testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i DMSO), der er testet ved en enkelt slutkoncentration i pladen på 0,2 %. Der foretages den samme fortynding som den, der er beskrevet for arbejdsopløsninger i punkt 15.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

17. Det dyrkningsmedium eller de arbejdsopløsninger, der er beskrevet i punkt 15 og 16, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede 24-brønds eller 96-brønds plade (jf. punkt 12). De behandlede plader inkuberes derefter i 24±0,5 timer ved 37°C og 5 % CO_2. Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at forsegle pladerne inden inkubation med testkemikalierne (20).

▼**M8**

Farvning med propidiumiodid (PI)

18. Efter 24±0,5 timers eksponering overføres cellerne til prøveglas og indsamles ved centrifugering. Supernatanterne kasseres, og de tilbageværende celler genopslæmmes i 200 µl (96-brønds plade) eller 600 µl (24-brønds plade) phosphatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 0,1 % bovint serumalbumin (farvebuffer). 200 µl af cellesuspensionen overføres til en rundbundet 96-brønds plade (ved 96 brønde) eller et mikrorør (ved 24 brønde) og vaskes to gange med 200 µl (ved 96 brønde) eller 600 µl (24 brønde) farvebuffer. Endelig genopslæmmes cellerne i farvebufferen (f.eks. 400 µl), og PI-opløsningen (f.eks. 20 µl) tilsættes (f.eks. er PI-opløsningens slutkoncentration 0,625 µg/ml). Andre cytotoksicitetsmarkører som f.eks. 7-aminoactinomycin D (7-AAD), trypanblåt eller andre kan anvendes, hvis det kan påvises, at denne alternative farvning giver resultater svarende til PI, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2.

Cytotoksicitetsmåling ved hjælp af flowcytometri og vurdering af CV75-værdien

19. PI-optaget analyseres ved hjælp af flowcytometri med kanal FL-3. Der høstes i alt 10 000 levende celler (PI negativ). Cellelevedygtigheden kan beregnes af cytometeranalyseprogrammet ved hjælp af nedenstående ligning. Når cellelevedygtigheden er lav, bør der høstes op til 30 000 celler inklusive døde celler. Alternativt kan der høstes data i et minut efter, at analysen er startet.

$$Cellelevedygtighed = \frac{Antal\ levende\ celler}{Antal\ høstede\ celler\ i\ alt} \times 100$$

CV75 værdien (jf. punkt 13), dvs. en koncentration, der viser overlevelse af 75 % THP-1-celler (25 % cytotoksisk effekt), beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

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

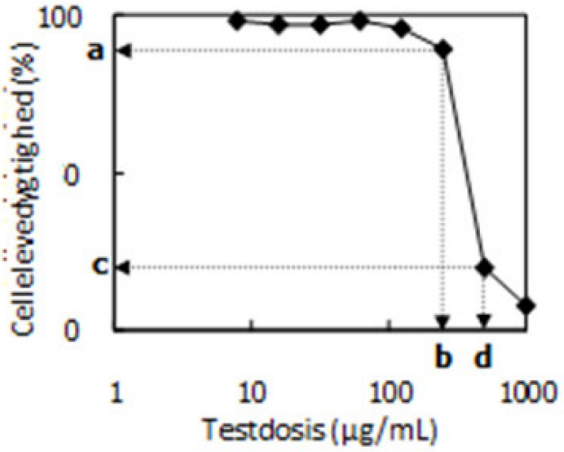
hvor:

a er minimumsværdien for cellelevedygtighed over 75 %

c er maksimumsværdien for cellelevedygtighed under 75 %

b og d er de koncentrationer, der giver henholdsvis a- og c-værdien for cellelevedygtighed.

▼**M8**



Der kan anvendes andre fremgangsmåder til at udlede CV75-værdien, når blot det påvises, at dette ikke har nogen indvirkning på resultaterne (f.eks. via testning af kompetencestofferne).

CD86/CD54-ekspressionsmåling

Præparering af testkemikalier og kontrolstoffer

20. Det egnede opløsningsmiddel/bærestof (fysiologisk saltopløsning, medium eller DMSO, jf. punkt 14) anvendes til at opløse eller dispergere testkemikalierne stabilt. Testkemikalierne opløses først i den koncentration, der svarer til 100-foldfortynding (fysiologiske saltopløsninger eller medium) eller 500-foldfortynding (DMSO) af 1,2 × CV75 fastlagt i *dosisbestemmelsesassayet* (jf. punkt 19). Hvis CV75 ikke kan bestemmes (dvs. hvis en tilstrækkelig cytotoksisk effekt ikke observeres i *dosisbestemmelsesassayet*), bør den højeste opløselige eller stabilt dispergerede koncentration af testkemikaliet fremstillet med hvert enkelt opløsningsmiddel/bærestof anvendes som startkoncentration. Bemærk, at slutkoncentrationen i pladen ikke bør overstige 5 000 µg/ml (ved fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 1 000 µg/ml (ved DMSO). Dernæst laves der 1,2-foldsseriefortyndinger ved hjælp af det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof for at opnå stamopløsninger (otte koncentrationer fra 100×1,2 × CV75 til 100×0,335 × CV75 (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller fra 500×1,2 × CV75 til 500×0,335 × CV75 (DMSO)), som testes ved hjælp af h-CLAT-metoden (se et eksempel på et doseringsskema i DB-ALM protokol nr. 158). Stamopløsningerne fortyndes yderligere 50-fold (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 250-fold (DMSO) i dyrkningsmediet (arbejdsopløsninger). Disse arbejdsopløsninger anvendes til slut til eksponering med en yderligere to-foldsfortyndingsfaktor i pladen. Hvis resultaterne ikke opfylder de i punkt 29 og 30 opstillede acceptkriterier for cellelevedygtighed, kan *dosisbestemmelsesassayet* gentages for at fastlægge en mere præcis CV75-værdi. Bemærk, at der kun kan anvendes 24-brønds plader til CD86/CD54-ekspressionsmåling.

21. Opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen fremstilles som beskrevet i punkt 16. Den positive kontrol, der anvendes i h-CLAT-metoden, er DNCB (jf. punkt 11), hvortil stamopløsningerne fremstilles i DMSO og fortyndes som beskrevet for stamopløsningerne i punkt 20. DNCB bør anvendes som den positive kontrol for *CD86/CD54-ekspressionsmåling* ved en enkelt slutkoncentration i pladen (typisk 4,0 µg/ml). For at opnå en 4,0 µg/ml koncentration af DNCB i pladen fremstilles en 2 mg/ml stamopløsning af DNCB i DMSO, som fortyndes yderligere 250-fold med dyrkningsmedium til en

▼M8

arbejdsopløsning på 8 µg/ml. Alternativt kan CV75-værdien af DNCB, der bestemmes i hver enkelt forsøgsfacilitet, anvendes som den positive kontrolkoncentration. Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien. Bemærk, at slutkoncentrationen i pladen ikke bør overstige 5 000 µg/ml (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 1 000 µg/ml (DMSO). Acceptkriterierne for analyseserien er de samme som dem, der er beskrevet for testkemikaliet (jf. punkt 29), med undtagelse af det sidste acceptkriterium, da den positive kontrol testes ved en enkelt koncentration.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

22. Der er behov for en test for hvert enkelt testkemikalie og kontrolstof for at opnå en forudsigelse. Hvert eksperiment består af mindst to uafhængige analyseserier for *CD86/CD54-ekspressionsmåling* (jf. punkt 26-28). Hver enkelt uafhængig analyseserie foretages på forskellige dage eller på samme dag, forudsat at der for hver analyseserie: a) fremstilles uafhængige friske stamopløsninger og arbejdsopløsninger af testkemikaliet og antistofopløsningerne og b) anvendes uafhængigt høstede celler (dvs. cellerne indsamles fra forskellige dyrkningsflasker). Cellerne kan imidlertid komme fra den samme generation. De testkemikalier og kontrolstoffer, der er fremstillet som arbejdsopløsninger (500 µl), blandes med 500 µl opslæmmede celler ($1x10^6$ celler) i forholdet 1:1, og cellerne inkuberes i 24±0,5 timer som beskrevet i punkt 20 og 21. Ved hver analyseserie er et enkelt replikat for hver koncentration af testkemikaliet og kontrolstoffet tilstrækkelig, fordi en forudsigelse opnås fra mindst to uafhængige analyseserier.

Cellefarvning og analyse

23. Efter 24±0,5 timers eksponering overføres cellerne fra 24-brønds pladen til prøveglas, indsamles ved centrifugering og vaskes derefter to gange med 1 ml farvebuffer (om nødvendigt kan der foretages yderligere vaskninger). Efter vask blokeres cellerne med 600 µl blokerende opløsning (farvebuffer indeholdende 0,01 % (vægt/volumen) globulin (Cohn fraktion II, III, human; SIGMA, #G2388-10G eller tilsvarende)) og inkuberes ved 4°C i 15 min. Efter blokering fordeles cellerne i tre delprøver a 180 µl i en rundbundet 96-brønds plade eller et mikrorør.

24. Efter centrifugering farves cellerne med 50 µl FITC-mærkede anti-CD86-, anti-CD54- eller muse-IgG1 (isotype)-antistoffer ved 4°C i 30 min. De antistoffer, der er beskrevet i h-CLAT DB-ALM protokol nr. 158 (18), bør anvendes ved at opløse 3:25 v/v (til CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) eller 3:50 volumen/volumen (til CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) og IgG1 (DAKO, #X0927)) med farvebuffer. Disse antistofopløsningsfaktorerblev af testudviklerne fastlagt som dem, der giver det bedste signal/støjforhold. Det er testudviklernes erfaring, at antistoffernes fluorescensintensitet normalt er konsekvent mellem forskellige partier. Brugerne kan imidlertid overveje at titrere antistofferne under deres egne laboratorieforhold for at finde frem til de koncentrationer, der er bedst egnede. Andre fluorchrom-mærkede anti-CD86- og/eller anti-CD54-antistoffer kan anvendes, hvis det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-konjugerede antistoffer, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. Det skal bemærkes, at ændring af klonen eller leverandøren af antistofferne som beskrevet i h-CLAT DB-ALM

▼M8

protokol nr. 158 (18) kan påvirke resultaterne. Efter vaskning to gange eller mere med 150 µl af farvebufferen genopslæmmes cellerne i farvebufferen (f.eks. 400 µl), og PI-opløsningen (f.eks. 20 µl for at opnå en endelig koncentration på 0,625 µg/ml) eller en anden cytotoksicitetsmarkøropløsning (jf. punkt 18) tilsættes. Ekspressionsniveauerne for CD86 og CD54 og cellelevedygtighed analyseres ved hjælp af flowcytometri.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

25. Ekspressionen af CD86 og CD54 analyseres ved hjælp af flowcytometri ved registreringskanal FL-1. På grundlag af det geometriske gennemsnit for fluorescensintensitet (MFI) beregnes den relative fluorescensintensitet (RFI) af CD86 og CD54 for positive kontrolceller (ctrl) og kemikaliebehandlede celler i henhold til nedenstående ligning:

$$RFI = \frac{MFI\ kemikaliebehandlet\ celle - MFI\ kemikaliebehandlede\ isotypekontrolceller}{MFI\ ctrlceller\ behandlet\ m\ opløsn/bærestof - MFI\ isotypectrlceller\ behandlet\ m\ opløsn/bærestof} \times 100$$

Cellelevedygtigheden fra isotypekontrolcellerne (der er farvet med muse-IgG1 (isotype)-antistoffer) beregnes ligeledes i henhold til den i punkt 19 beskrevne ligning.

Forudsigelsesmodel

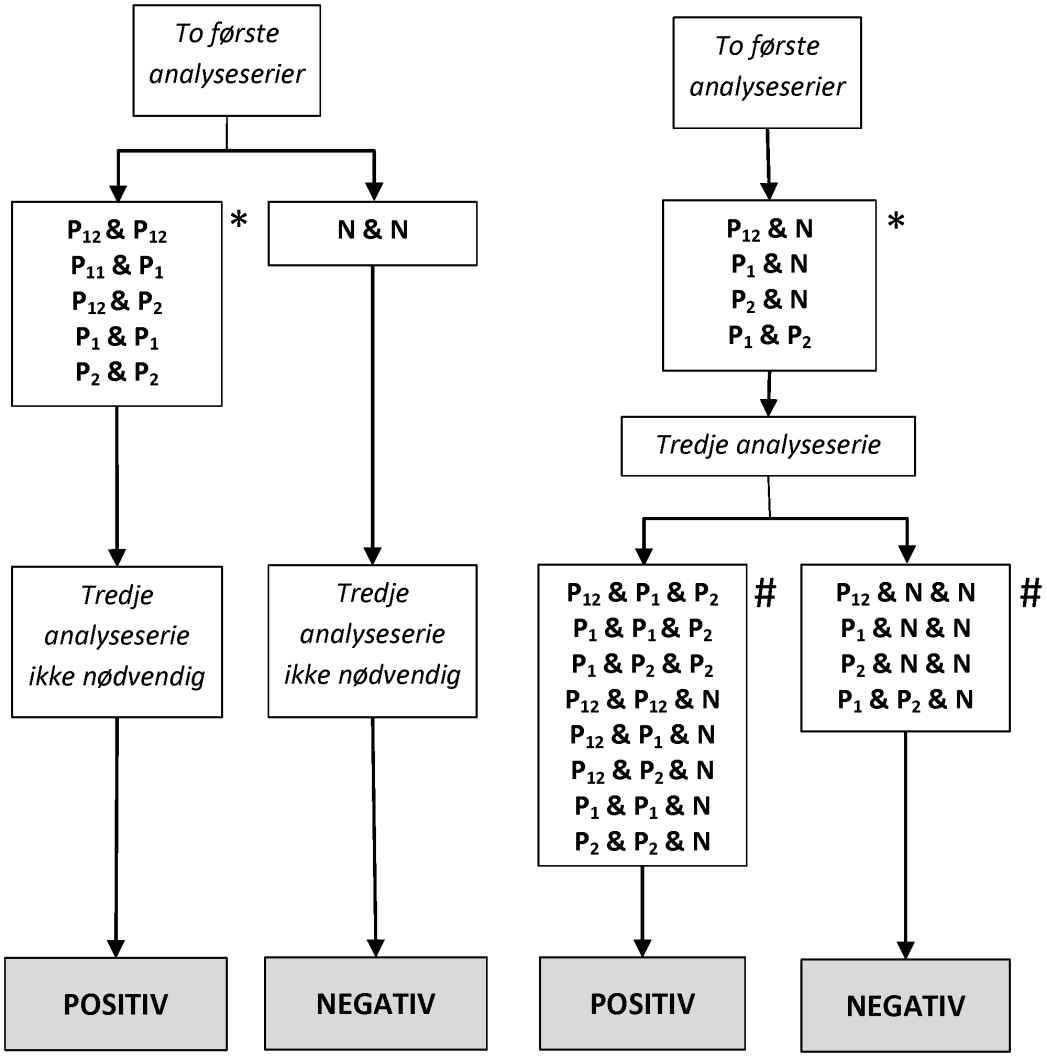
26. I forbindelse med *CD86/CD54*-ekspressionsmåling testes hvert testkemikalie i mindst to uafhængige analyseserier for at udlede en enkelt forudsigelse (POSITIV eller NEGATIV). En h-CLAT-forudsigelse anses for at være POSITIV, hvis mindst en af følgende betingelser er opfyldt i to ud af to eller mindst to ud af tre uafhængige analyseserier, ellers anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV (figur 1):

— RFI for CD86 svarer til eller er højere end 150 % ved enhver testet koncentration (med en cellelevedygtighed ≥ 50 %).

— RFI for CD54 svarer til eller er højere end 200 % ved enhver testet koncentration (med en cellelevedygtighed ≥ 50 %).

27. Det fremgår af det ovenstående, at såfremt de første to analyseserier begge er positive for CD86 og/eller begge er positive for CD54, anses h-CLAT-forudsigelsen for at være POSITIV, og det er ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. Tilsvarende, hvis de to første analyseserier er negative for begge markører, anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV (med behørig hensyntagen til bestemmelserne i punkt 30), uden at det er nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. Hvis de to første analyseserier imidlertid ikke er overensstemmende for mindst en af markørerne (CD54 eller CD86), er der behov for en tredje analyseserie, og den endelige forudsigelse vil blive baseret på flertallet af de tre individuelle analyseserier (dvs. to ud af tre). Det skal i denne forbindelse bemærkes, at hvis der foretages to uafhængige analyseserier, og den ene kun er positiv for CD86 (herefter benævnt P_1), mens den anden kun er positiv for CD54 (herefter benævnt P_2), bør der gennemføres en tredje analyseserie. Hvis denne tredje analyseserie er negativ for begge markører (herefter benævnt N), anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV. Hvis en tredje analyseserie på den anden side er positiv for en af markørerne (P_1 eller P_2) eller for begge markørerne (herefter benævnt P_{12}), anses h-CLAT-forudsigelsen for at være POSITIV.

▼**M8**



Figur 1: Den forudsigelsesmodel, der anvendes i h-CLAT-metoden. En h-Clat-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. P_1: analyseserie med kun CD86 positiv; P_2: analyseserie med kun CD54 positiv; P_{12}: analyseserie med både CD86 og CD54 positiv; N: analyseserie med hverken CD86 eller CD54 positiv.#Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de tre analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de to første analyseserier vist i boksen ovenfor, men afspejler ikke den rækkefølge, i hvilken de er opnået.

28. For de testkemikalier, der forudsiges at være POSITIVE med h-CLAT, kan der, hvis det ønskes, fastsættes to værdier for effektiv koncentration (EC), EC150 for CD86 og EC200 for CD54, dvs. den koncentration, ved hvilken testkemikalierne gav en RFI på 150 eller 200. Disse EC-værdier kan også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (9), når de bruges i integrerede tilgange såsom IATA (4) (5) (6) (7) (8). De kan beregnes ved hjælp af følgende ligninger:

▼**M8**

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

hvor

A_{conc} er den laveste koncentration udtrykt i µg/ml med RFI > 150 (CD86) eller 200 (CD54)

$25B_{conc}$ er den højeste koncentration udtrykt i µg/ml med RFI < 150 (CD86) eller 200 (CD54)

A_{RFI} er RFI ved den laveste koncentration med RFI > 150 (CD86) eller 200 (CD54)

B_{RFI} er RFI ved den højeste koncentration med RFI < 150 (CD86) eller 200 (CD54).

Med henblik på mere præcist at udlede EC150- og EC200-værdierne, kan det være nødvendigt med tre uafhængige analyseserier for *CD86/CD54-ekspressionsmåling*. De endelige EC150- og EC200-værdier fastsættes derefter som en gennemsnitsværdi af EC-værdierne beregnet på grundlag af tre uafhængige analyseserier. Når kun to ud af tre uafhængige analyseserier opfylder kriterierne for positivitet (jf. punkt 26-27), vælges den højeste EC150- eller EC200-værdi af de to beregnede værdier.

Acceptkriterier

29. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når h-CLAT-metoden anvendes (22) (27):

— Cellelevedygtigheden i mediekontrollen og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør være højere end 90 %.

— I opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør RFI-værdierne for både CD86 og CD54 ikke overstige de positive kriterier (CD86 RFI ≥ 150 % og CD54 RFI ≥ 200 %). RFI-værdierne i opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af den formel, der er beskrevet i punkt 25 ("MFI for kemikaliet" erstattes med "MFI for opløsningsmiddel/bærestof", og "MFI for opløsningsmiddel/bærestof" erstattes af "MFI for (medium) kontrol").

— >I både mediekontrollen og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør MFI-forholdet mellem både CD86 og CD54 og isotypekontrollen være > 105 %.

— I den positive kontrol (DNCB), bør RFI-værdierne for både CD86 og CD54 opfylde de positive kriterier (CD86 RFI ≥ 150 og CD54 RFI ≥ 200), og cellelevedygtigheden bør være højere end 50 %.

— For testkemikaliet bør cellelevedygtigheden være højere end 50 % ved mindst fire testede koncentrationer i hver analyseserie.

30. Negative resultater accepteres kun for testkemikalier, der fremviser en cellelevedygtighed på under 90 % ved den højeste testede koncentration (dvs. 1,2 × CV75 i henhold til den fortyndingsserie, der er beskrevet i punkt 20). Hvis cellelevedygtigheden ved 1,2 × CV75 svarer til eller er højere end 90 %, bør det negative resultat kasseres. I sådanne tilfælde anbefales det, at det forsøges at finjustere dosisbestemmelsen ved at gentage bestemmelsen af CV75. Det bemærkes, at når 5 000 µg/ml i fysiologisk saltopløsning (eller medium eller andre opløsningsmidler/bærestoffer), 1 000 µg/ml i DMSO eller den højeste opløselige koncentration anvendes som den maksimale testkoncentration af et testkemikalie, er et negativt resultat acceptabelt, selv om cellelevedygtigheden ligger på over 90 %.

▼**M8**

Testrapport

31. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, log Kow, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger

— så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

— fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Kontrol

Positiv kontrol

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, log K_{ow}, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

▼M8

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien, hvis det er relevant.

Negativ kontrol og opløsningsmiddel-/bærestofkontrol

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— beskrivelse af den anvendte test

— anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)

— den anvendte flowcytometri (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, globulin, antistoffer og anvendt cytotoksicitetsmarkør

— den procedure, der er blevet anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden via testning af kompetencestoffer, og den metode, der er blevet anvendt til at påvise reproducerbare resultater over tid, f.eks. historiske kontroldata og/eller historiske reaktivitetskontroldata.

Acceptkriterier for testen

— cellelevedygtigheds-, MFI- og RFI-værdier opnået ved opløsningsmiddel-/bærestofkontrol sammenlignet med acceptintervallerne

— cellelevedygtigheds- og RFI-værdier opnået ved den positive kontrol sammenlignet med acceptintervallerne

— cellelevedygtigheden ved alle de testede koncentrationer af det testede kemikalie.

▼M8

Forsøgsmetode

— antal anvendte analyseserier

— koncentrationer af testkemikaliet, anvendt påførsels- og eksponeringstid (hvis en anden end den anbefalede)

— beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

— tabulering af data, herunder CV75 (hvis muligt), individuelle geometriske MFI-, RFI-, cellelevedygtighedsværdier, EC150/EC200-værdier (hvis muligt), opnået for testkemikaliet og for den positive kontrol i hver enkelt analyseserie, og en angivelse af klassificeringen af testkemikaliet i forhold til forudsigelsesmodellen

— beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultater

— diskussion af de resultater, der er opnået med h-CLAT-metoden

— vurdering af testresultaterne inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusioner

LITTERATUR

(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. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation test: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23 ff. Tilgængelig på: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (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 ff.

(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. Tilgængelig på: 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 Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Tillæg 1.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af betydning (22).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV75: Den anslåede koncentration, der giver en cellelevedygtighed på 75 %.

EC150: De koncentrationer, der viser RFI-værdier på 150 i CD86-ekspressionen.

EC200: De koncentrationer, der viser RFI-værdier på 200 i CD54-ekspressionen.

Flowcytometri: En cytometrisk teknik, i hvilken celler opslæmmet i en væske flyder en ad gangen gennem et fokus bestående af magnetiserende lys, som spredes i mønstre, der er karakteristiske for cellerne og deres bestanddele. Cellerne mærkes hyppigt med fluorescerende markører, så lyset først absorberes og derefter udsendes ved ændrede frekvenser.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

Mediekontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et forsøgssystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet/bærestoffet interagerer med forsøgssystemet.

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

▼M8

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver allergifremkaldende via abiotisk omdannelse.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relativ fluorescensintensitet (RFI): Relative værdier af det geometriske gennemsnit af fluorescensintensitet (MFI) i kemisk behandlede celler sammenlignet med MFI i celler behandlet med opløsningsmiddel/bærestof.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (21).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (21).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (21).

Farvebuffer: En phosphatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 0,1 % bovint serumalbumin.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af et forsøg, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (21).

Stof: Et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne metode.

▼M8

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (23).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig test: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål (21).

▼**M8**

Tillæg 1.2

KOMPETENCESTOFFER

Før den rutinemæssige brug af den test, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede h-CLAT-forudsigelse på korrekt vis for de ti kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de CV75-, EC150- og EC200-værdier, der falder ind under de respektive referenceintervaller for otte ud af de ti kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der er genereret in vitro-data af høj kvalitet med h-CLAT-forsøgsmetoden. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for h-CLAT-metoden (3) (14).

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til h-CLAT-metoden

Kompetencestoffer	CAS RN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse (1)	CV75-reference-område i µg/ml (2)	h-CLAT-resultater for CD86 (EC150-reference-interval i µg/ml) (2)	h-CLAT-resultater for CD54 (EC200-reference-interval i µg/ml) (2)
2,4-Dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast stof	Sensibiliserende stof (ekstrem)	2-12	Positiv (0,5-10)	Positiv (0,5-15)
4-Phenylenediamin	106-50-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (stærk)	5-95	Positiv (<40)	Negativ (>1,5) (3)
Nikkelsulfat	10101-97-0	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	30-500	Positiv (<100)	Positiv (10-100)
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	30-400	Negativ (>10) (3)	Positiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Væske	Sensibiliserende stof (svag)	>20	Negativ (>5) (3)	Positiv (<250)
Imidazolidinyl-urinstof	39236-46-9	Fast stof	Sensibiliserende stof (svag)	25-100	Positiv (20-90)	Positiv (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Væske	Ikke-sensibiliserende	>5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
Glycerol	56-81-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	>5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
Mælkesyre	50-21-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	1500-5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
4-Aminobenzoesyre	150-13-0	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	> 1 000	Negativ (>1 000)	Negativ (>1 000)

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

(1) Prognoser for in vivo-fare (og styrke) er baseret på LLNA-data (3) (14). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (24).

(2) På baggrund af historiske observerede værdier (13) (25).

(3) Historisk set er der opnået en overvægt af negative resultater for denne markør, derfor forventes for det meste et negativt resultat. Det angivne interval blev fastlagt på grundlag af de få historiske positive resultater, der er observeret. Opnås der et positivt resultat, bør EC-værdien ligge inden for det angivne referenceinterval.

▼**M8**

Tillæg 2

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: U937 CELL LINE ACTIVATION TEST (U-SENS™)

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. U-SENS™ måler ændringer i ekspressionen af celleoverflademarkører i tilknytning til processen med aktivering af monocyter og dendritiske celler (DC) (dvs. CD86) i den humane histiocytære lymfomcellelinje U937 efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (1). De målte ekspressionsniveauer for celleoverflademarkøren CD86 i cellelinjen U937 anvendes dernæst til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

2. U-SENS™ er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse (2) koordineret af l'Oreal, og efterfølgende foretog det videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) under EU-referencelaboratoriet for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) uafhængige peer reviews (3). På grundlag af alle de tilgængelige beviser og input fra myndigheder og interessenter anbefalede EURL ECVAM (4), at U-SENS™ anvendes som en del af en IATA til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. OECD drøfter i øjeblikket i sit vejledende dokument om rapportering af strukturerede tilgange til dataintegration og individuelle informationskilder, der anvendes inden for IATA for hudsensibilisering, en række casestudier, der beskriver forskellige forsøgsstrategier og forudsigelsesmodeller. En af de forskelligt definerede tilgange er baseret på U-SENS™-assayet (5). Der kan også findes eksempler på anvendelsen af U-SENS™-data i kombination med anden information, herunder historiske data og eksisterende gyldige humane data (6), andre steder i litteraturen (4) (5) (7).

3. Det viste sig, at U-SENS™-metoden kunne overføres til laboratorier med erfaring inden for celledyrkningsteknikker og flowcytometrianalyse. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra testen, ligger i størrelsesordenen henholdsvis 90 % og 84 % inden for og mellem laboratorier (8). De resultater, der genereres i valideringsundersøgelsen (8), og andre offentliggjorte undersøgelser (1), viser generelt, at nøjagtigheden med hensyn til sondring mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer er på 86 % (N=166) med en følsomhed på 91 % (118/129) og en specificitet på 65 % (24/37) sammenlignet med LLNA-resultaterne. Sammenlignet med resultater fra mennesker er nøjagtigheden med hensyn til sondring mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer på 77 % (N=101) med en følsomhed på 100 % (58/58) og en specificitet på 47 % (20/43). Sammenlignet med LLNA er det mere sandsynligt, at falsk negative forudsigelser i forbindelse med U-SENS™ vil vedrøre kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1B) end kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (1) (8) (9). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af U-SENS™-metoden som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfarer. De nøjagtige værdier, der her angives for U-SENS™ som en selvstændig test, er imidlertid kun vejledende, da testen bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-forsøg samt andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

▼M8

4. På grundlag af de data, der foreligger i øjeblikket, viste U-SENS™-testen sig at kunne anvendes på testkemikalier (herunder ingredienser i kosmetik, f.eks. konserveringsmidler, overfladeaktive stoffer, aktive stoffer, farvestoffer) omfattende en lang række organiske funktionelle gruppers fysisk-kemiske egenskaber, hudsensibiliseringsstyrke (som bestemt i in vivo-undersøgelser) og det spektrum af reaktionsmekanismer, som man ved, er knyttet til hudsensibilisering (dvs. Michael acceptor, Schiff basedannelse, acyloverførselsmiddel, bimolekylær nucleofil substitutionsreaktion [SN2], eller nukleofil aromatisk substitution [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENS™-metoden kan anvendes til at teste kemikalier, der er opløselige, eller som danner en stabil dispersion (dvs. en kolloid opløsning eller en suspension, i hvilken testkemikaliet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet/bærestoffet i forskellige faser) i et passende opløsningsmiddel/bærestof (jf. punkt 13). Kemikalier, der i datasættet blev angivet som præ-haptener (dvs. stoffer, der aktiveres ved oxidering) eller pro-haptener (dvs. stoffer, der kræver en enzymaktivering, f.eks. via P450 enzymer),blev korrekt forudsagt af U-SENS™ (1) (10). Membranforstyrrende stoffer kan føre til falsk positive resultater som følge af en ikke-specifik stigning i CD86-ekspressionen, eftersom tre ud af syv falske positiver i tilknytning til in vivo-referenceklassificeringen var overfladeaktive stoffer (1). Positive resultater med overfladeaktive stoffer som sådan bør betragtes med forsigtighed, mens negative resultater af overfladeaktive stoffer fortsat kan anvendes til støtte for identifikationen af testkemikaliet som et ikke-sensibiliserende stof. Fluorescerende testkemikalier kan vurderes med U-SENS™ (1), men stærkt fluorescerende testkemikalier, der udsender den samme bølgelængde som fluoresceinisothiocyanat (FITC) eller propidiumiodid (PI), vil interferere med den flowcytometriske påvisning og kan derfor ikke evalueres korrekt ved hjælp af FITC-konjugerede antistoffer (potentielt falske negativer) eller PI (levedygtighed er ikke målbar). I sådanne tilfælde kan henholdsvis andre flourochrom-mærkede antistoffer eller andre cytotoksicitetsmarkører anvendes, når blot det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-mærkede antistoffer eller PI (jf. punkt 18) f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2-2. I lyset af det ovenstående bør positive resultater med overfladeaktive stoffer og negative resultater med stærke fluorescerende testkemikalier fortolkes på baggrund af de fastsatte begrænsninger og sammen med andre informationskilder inden for rammerne af IATA. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at U-SENS™-metoden ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.

5. Som beskrevet ovenfor understøtter U-SENS™ differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Den kan imidlertid også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken, når den anvendes i integrerede tilgange såsom IATA. Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, for at fastslå, hvordan U-SENS™-resultaterne eventuelt kan anvendes til styrkevurderingen.

6. Definitioner findes i tillæg 2.1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. U-SENS™-metoden er et in vitro-assay, der måler ændringerne i ekspressionen af CD86-celleoverfladmarkøren på en human histiocytær lymfomcellelinje, U937, efter 45±3 timers eksponering for testkemikaliet. CD86-overfladmarkøren er en typisk markør for U937-aktivering. CD86 er kendt som et medstimulerende molekyle, der kan efterligne monocytisk aktivering, som spiller en afgørende rolle i primingen af T-celler. Ændringerne i ekspressionen af CD86-overfladmarkøren måles ved hjælp af flowcytometri efter cellefarvning med fluoresceinisothiocyanat (FITC)-mærkede antistoffer. Cytotoksicitetsmålingen foretages (f.eks. ved hjælp af PI) samtidig med

▼M8

henblik på at vurdere, om forøgelsen af ekspressionen af CD86-celleoverflademarkøren optræder ved subcytotoksiske koncentrationer. Stimuleringsindekset (SI) for CD86-celleoverflademarkøren sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af forudsigelsesmodellen (jf. punkt 19) til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

8. Forud for den rutinemæssige brug af den test, der beskrives i dette tillæg til forsøgsmetoden B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de ti kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. i overensstemmelse med Good *in vitro* Method Practices (11). Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 11) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 15-16), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

FREMGANGSMÅDE

9. Dette forsøg er baseret på U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) protokol nr. 183 (12). Der bør anvendes standardprocedurer (SOP) ved gennemførelsen og anvendelsen af U-SENS™-metoden i laboratoriet. Et automatiseret system til gennemførelse af U-SENS™ kan anvendes, hvis det kan påvises, at det giver tilsvarende resultater, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. Følgende er en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i forbindelse med U-SENS™-testen.

Præparering af celler

10. Den humane histiocytære lymfomcellelinje, U937 (13), bør anvendes til udførelse af U-SENS™-testen. Celler (klon CRL1593.2) bør anskaffes fra en velrenommeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection.

11. U937-celler dyrkes i en fugtig atmosfære ved 37 °C og 5 % CO_2 og i RPMI-1 640-medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (komplet medium). U937-celler opformeres rutinemæssigt hver 2. eller 3. dag ved en celletæthed på henholdsvis 1,5 eller 3×10^5 celler/ml. Celletætheden bør ikke overstige 2×10^6 celler/ml, og cellelevedygtigheden målt ved trypanblåudelukkelse bør være ≥ 90 % (bør ikke anvendes ved den første opformering efter optøning). Inden cellerne anvendes til testning, bør hver enkelt celleportion, FCS eller antistoffer valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Reaktivitetskontrollen af cellerne bør foretages ved hjælp af den positive kontrol, picrylsulfonsyre (2,4,6-Trinitrobenzensulfonsyre: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, ≥ 99 % renhed), og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % renhed), mindst en uge efter optøning. Ved reaktivitetskontrollen bør seks slutkoncentrationer testes for hver af de to kontroller (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml og LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS opløst i komplet medium bør give en positiv og koncentrationsbestemt respons for CD86 (f.eks. når en positiv koncentration, CD86 SI ≥ 150, efterfølges af en koncentration med en øget CD86 SI), og LA opløst i komplet medium bør give en negativ respons for CD86 (jf. punkt 21). Kun den celleportion, der har bestået reaktivitetskontrollen to gange, bør anvendes til assayet. Celler kan opformeres op til syv uger efter optøning. Der bør højst foretages 21 opformeringer. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 18-22.

▼M8

12. Til testning podes U937-cellerne ved en celletæthed på enten 3×10^5 celler/ml eller 6×10^5 celler/ml, og de forkultiveres i dyrkningsflasker i henholdsvis to dage eller én dag. Der kan anvendes andre forkultiveringsforhold end de ovenfor nævnte, hvis der fremlægges tilstrækkeligt videnskabeligt belæg herfor, f.eks. via en testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. På dagen for testningen genopslæmmes de celler, der høstes fra dyrkningsflasken, i nyt dyrkningsmedium med en celletæthed på 5×10^5 celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet 96-brønds plade med 100 µl (endelig celletæthed på $0{,}5 \times 10^5$ celler/brønd).

Fremstilling af testkemikalier og kontrolstoffer

13. Der foretages en vurdering af opløseligheden forud for testningen. Med henblik herpå opløses testkemikalierne, eller de dispergeres stabilt ved en koncentration på 50 mg/ml i et komplet medium som det første valg af opløsningsmiddel eller i dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % renhed) som det andet valg af opløsningsmiddel/bærestof, hvis testkemikaliet ikke er opløseligt i det komplette mediumopløsningsmiddel/-bærestof. Når testkemikaliet skal anvendes i testen, opløses det til en slutkoncentration på 0,4 mg/ml i komplet medium, hvis kemikaliet er opløseligt i dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis kemikaliet kun er opløseligt i DMSO, opløses det til en koncentration på 50 mg/ml. Andre opløsningsmidler/bærestoffer end de ovenfor beskrevne kan anvendes, hvis der er videnskabeligt belæg herfor. Der bør tages hensyn til testkemikaliets stabilitet i det endelige opløsningsmiddel/bærestof.

14. Testkemikalierne og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. Da der ikke foretages et dosisbestemmelsesassay, bør seks slutkoncentrationer testes ved første analyseserie (1, 10, 20, 50, 100 og 200 µg/ml) i det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof enten i komplet medium eller i 0,4 % DMSO i mediet. Ved de efterfølgende analyseserier begyndende med 0,4 mg/ml i komplet medium eller 50 mg/ml i DMSO fremstilles opløsninger af testkemikaliet (dvs. mindst fire koncentrationer) ved hjælp af det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof. Arbejdsopløsningerne anvendes til slut til behandling ved at tilsætte lige store mængder af U937-cellesuspensionen (jf. punkt 11 ovenfor) til mængden af arbejdsopløsningen på pladen for at opnå en yderligere tofoldsopløsning (12). Koncentrationerne (mindst fire koncentrationer) til eventuelle yderligere analyseserier vælges på grundlag af de individuelle resultater af alle de tidligere analyseserier (8). De slutkoncentrationer, der kan anvendes, er 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 og 200 µg/ml. Den maksimale slutkoncentration er 200 µg/ml.Hvis der observeres en positiv CD86-værdi ved 1 µg/ml, evalueres en koncentration på 0,1 µg/ml for at finde frem til den koncentration af testkemikaliet, der ikke inducerer CD86 over den positive tærskel. EC150 (den koncentration, ved hvilken et kemikalie når den positive CD86-tærskel på 150 %, jf. punkt 19) beregnes for hver analyseserie, hvis en positiv CD86-koncentration/respons observeres. Hvor testkemikaliet inducerer en positiv CD86-respons, der ikke er koncentrationafhængig, er EC150 måske ikke relevant som beskrevet i U-SENS™ DB-ALM protokol nr. 183 (12). For hver analyseserie beregnes CV70 (den koncentration, ved hvilket kemikaliet når cytotoksicitetsgrænsen på 70 %, se punkt 19), når det er muligt (12). Med henblik på at undersøge koncentration/responsvirkningen af stigningen i CD86 bør en hvilken som helst koncentration fra de koncentrationer, der kan anvendes, vælges jævnt fordelt mellem EC150 (eller den højeste CD86-negative ikke-cytotoksiske koncentration) og CV70 (eller den højeste tilladte koncentration, dvs. 200 µg/ml). Der bør testes minimum fire koncentrationer i hver analyseserie, idet mindst to af koncentrationerne skal være de samme som i den/de tidligere analyseserie/analyseserier med henblik på sammenligning.

▼M8

15. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, der anvendes i U-SENS™-testen, er komplet medium (for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i komplet medium) (jf. punkt 4) eller 0,4 % DMSO i komplet medium (for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i DMSO).

16. Den positive kontrol, der anvendes i U-SENS™-testen, er TNBS (jf. punkt 11), der fremstilles i komplet medium. TNBS bør anvendes som den positive kontrol ved CD86-ekspressionsmåling ved en enkelt slutkoncentration i pladen (50 μg/ml), der giver en cellelevedygtighed på > 70 %. For at opnå en 50 μg/ml koncentration af TNBS i pladen fremstilles 1 M (dvs. 293 mg/ml) stamopløsning af TNBS i komplet medium, som fortyndes yderligere 2 930-fold med komplet medium til en arbejdsopløsning på 100 μg/ml. Mælkesyre (LA, CAS 50-21-5) bør anvendes som den negative kontrol ved 200 μg/ml opløst i komplet medium (fra en stamopløsning på 0,4 mg/ml). I hver enkelt plade for hver enkelt analyseserie fremstilles tre replikater af komplet medium ubehandlet kontrol, opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, negative og positive kontroller (12). Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien. Acceptkriterierne for analyseserien er de samme som dem, der er beskrevet for testkemikaliet (jf. punkt 12).

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

17. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og de arbejdsopløsninger, der er beskrevet i punkt 14-16, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede 96-brønds plade (jf. punkt 12). De behandlede plader inkuberes derefter i 45±3 timer ved 37 °C og 5 % CO_2. Forud for inkubationen forsegles pladerne med en semipermeabel membran for at undgå fordampning af flygtige testkemikalier og krydskontaminering mellem celler, der er behandlet med testkemikalier (12).

Cellefarvning

18. Efter 45±3 timers eksponering overføres cellerne til en V-formet mikrotiterplade og indsamles ved centrifugering. Opløselighedsinterferens defineres som krystaller eller dråber, der observeres under mikroskop 45 ± 3 timer efter behandling (før cellefarvning). Supernatanterne kasseres, og de tilbageværende celler vaskes en gang med 100 μl af en iskold phosphatbufret fysiologisk saltopløsning (PBS) indeholdende 5 % føtalt kalveserum (farvebuffer). Efter centrifugering genopslæmmes cellerne med 100 μl af farvebufferen og farves med 5 μl (dvs. 0,25 μg) FITC-mærket anti-CD86- eller muse-IgG1 (isotype)-antistoffer ved 4 °C i 30 min. i mørke. De antistoffer, der er beskrevet i U-SENS™ DB-ALM protokol nr. 183 (12), bør anvendes (for CD86: BD-PharMingen #5556 57 Klon: Fun-1, eller Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klon: BU63; og for IgG1: BD-PharMingen #5557 48 eller Caltag/Invitrogen # GM4992). Det er testudviklernes erfaring, at antistoffernes fluorescensintensitet normalt er konsekvent mellem forskellige partier. Andre kloner eller leverandører af antistoffer, der har bestået reaktivitetskontrollen, kan anvendes til assayet (jf. punkt 11).Brugerne kan dog overveje at titrere antistofferne under deres egne laboratorieforhold for at finde frem til de koncentrationer, der er bedst egnede. Andre påvisningssystemer som f.eks. fluorchrom-mærkede anti-CD86-antistoffer kan anvendes, hvis det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-konjugerede antistoffer, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. Efter vask med 100 μl farvebuffer to gange og en gang med 100 μl iskold

▼M8

PBS genopslæmmes cellerne i iskold PBS (f.eks. 125 µl for prøver, der analyseres manuelt rør for rør, eller 50 µl, når der anvendes en auto-sampler plade), og PI-opløsning tilsættes (slutkoncentration på 3 µg/ml). Andre cytotoksicitetsmarkører som f.eks. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), eller trypanblåt kan anvendes, hvis det kan påvises, at denne alternative farvning giver resultater svarende til PI, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2.

Flowcytometrianalyse:

19. Ekspressionsniveauerne for CD86 og cellelevedygtigheden analyseres ved hjælp af flowcytometri. Cellerne vises i et punktdiagram over størrelse (FSC) og granularitet (SSC) i logaritmisk skala for klart at identificere populationen i en første gate R1 og eliminere affald. Der høstes i alt 10 000 celler i gate R1 for hver enkelt brønd. Celler fra den samme gate R1 vises i et FL3- eller FL4/SSC-punktdiagram. De levedygtige celler beskrives ved at anbringe en anden gate R2, der frasorterer populationen af propidiumiodid-negative celler (kanal FL3 eller FL4). Cellelevedygtigheden kan beregnes af cytometeranalyseprogrammet ved hjælp af nedenstående ligning. Når cellelevedygtigheden er lav, kan der høstes op til 20 000 celler inklusive døde celler. Alternativt kan der høstes data i et minut efter, at analysen er startet.

$$Cellelevedygtighed = \frac{Antal\ levende\ celler}{Antal\ høstede\ celler\ i\ alt} \times 100$$

Procentdelen af FL1-positive celler måles dernæst blandt disse levedygtige celler, der er gated på R2 (inden for R1). Celleoverfladeekspressionen af CD86 analyseres i et FL1/SSC punktdiagram gated på levedygtige celler (R2).

For komplet medium-/IgG1-brønde sættes analysemarkøren tæt på hovedpopulationen, så de komplette mediekontroller har IgG1, der ligger inden for målområdet på 0,6 til 0,9 %.

Farveinterferens defineres som en ændring af det FITC-mærkede IgG1-punktdiagram (IgG1 FL1 Geo Mean SI ≥ 150 %).

Stimuleringsindekset (SI) for CD86 i kontrolcellerne (ubehandlede eller i 0,4 % DMSO) og de kemisk behandlede celler beregnes i henhold til nedenstående ligning:.

$$S.I. = \frac{\%\ af\ CD86^{+} behandlede\ celler - \%\ af\ IgG1^{+} behandlede\ celler}{\%\ af\ CD86^{+} kontrolceller - \%\ af\ IgG1^{+} kontrolceller} \times 100$$

% af ubehandlede $IgG1^{+}$ kontrolceller: benævnt procentdelen af FL1-positive IgG1-celler defineret med analysemarkøren (accepteret interval på ≥ 0,6 % og < 1,5 %, jf. punkt 22) blandt de ubehandlede levedygtige celler.

% af $IgG1^{+}$/$CD86^{+}$-kontrolceller/behandlede celler: benævnt procentdelen af FL1-positive IgG1/CD86-celler målt uden at flytte analysemarkøren blandt de levedygtige kontrolceller/behandlede celler.

▼**M8**

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

20. Følgende parametre beregnes i U-SENS™ -testen: CV70-værdien, dvs. en koncentration, der giver en U937-celleoverlevelse på 70 % (30 % cytotoksisk effekt), og EC150-værdien, dvs. den koncentration, ved hvilken testkemikalierne inducerede et CD86-stimuleringsindeks (SI) på 150 %.

CV70 beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

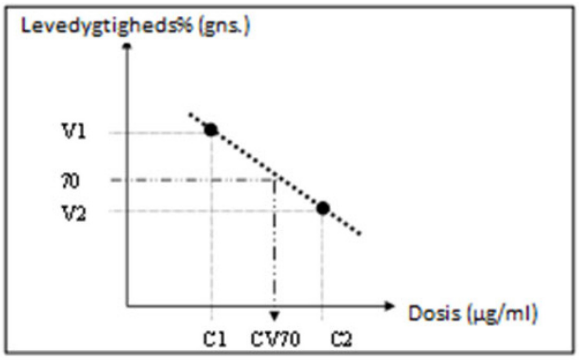
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

hvor:

V1 er minimumsværdien for cellelevedygtighed over 70 %

V2 er maksimumsværdien for cellelevedygtighed under 70 %

C1 og C2 er de koncentrationer, der viser henholdsvis V1 og V2-værdien for cellelevedygtighed.



Der kan anvendes andre fremgangsmåder til at udlede CV70-værdien, når blot det påvises, at dette ikke har nogen indvirkning på resultaterne (f.eks. via testning af kompetencestofferne).

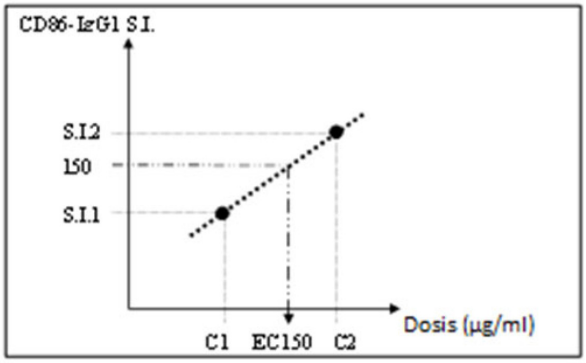
EC150 beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

EC150 = C1 + [(150 – SI1) / (SI2 – SI1) * (C2 – C1)]

hvor:

C1 er den højeste koncentration udtrykt i µg/ml med et CD86 SI < 150 % (SI 1)

C2 er den laveste koncentration udtrykt i µg/ml med et CD86 SI < 150 % (SI 2).



▼**M8**

EC150- og CV70-værdierne beregnes

— For hver analyseserie: De individuelle EC150- og CV70-værdier anvendes som redskaber til at undersøge koncentration/responsvirkningen af stigningen i CD86 (jf. punkt 14).

— Den overordnede CV70 bestemmes på grundlag af den gennemsnitlige levedygtighed (12).

— De overordnede EC150-værdier bestemmes for det testkemikalie, der forudsiges at være POSITIVT med U-SENS™, på grundlag af de gennemsnitlige SI for CD86-værdierne (jf. punkt 21) (12).

Forudsigelsesmodel

21. I forbindelse med CD86-ekspressionsmåling testes hvert testkemikalie i mindst fire koncentrationer og i mindst to uafhængige analyseserier (der foretages på forskellige dage) for at udlede en enkelt forudsigelse (POSITIV eller NEGATIV).

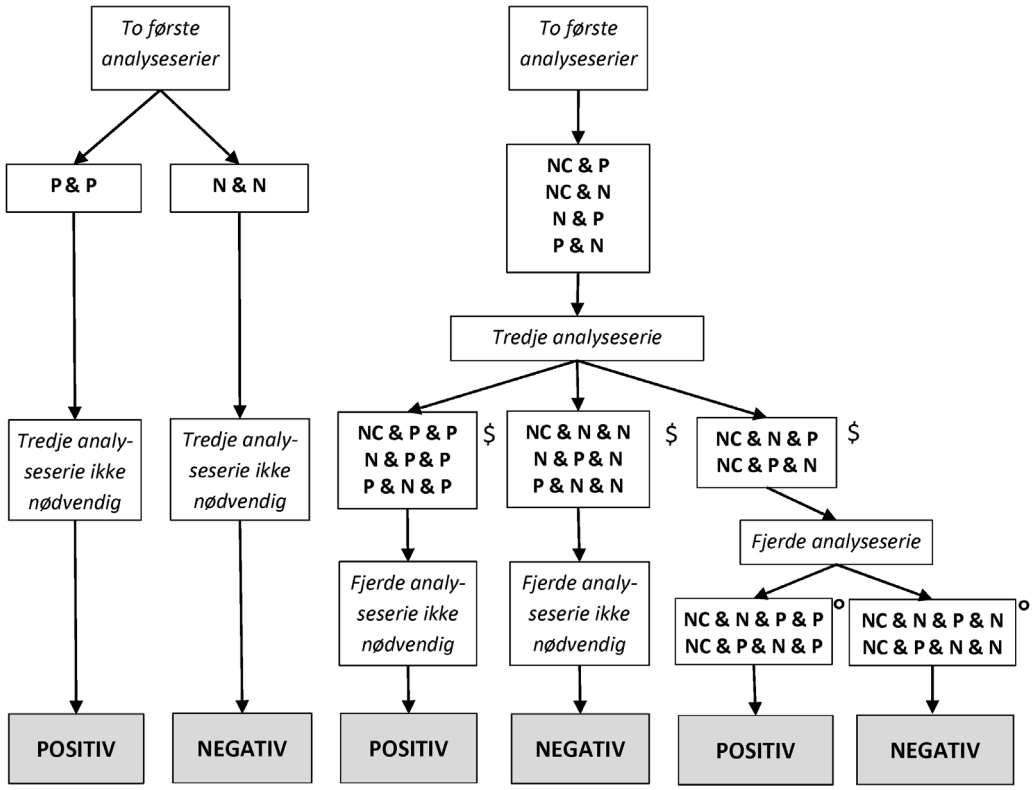
— Den individuelle konklusion på en U-SENS™-analyseserie betragtes som NEGATIV (herefter N), hvis SI for CD86 er på under 150 % ved alle ikke-cytotoksiske koncentrationer (cellelevedygtighed ≥ 70 %), og hvis der ikke observeres nogen interferens (cytotoksisk effekt, opløselighed: jf. punkt 18 eller farve: jf. punkt 19, uanset ved hvilke ikke-cytotoksiske koncentrationer interferens påvises). I alle andre tilfælde: SI for CD86 er højere end eller lig med 150 %, og/eller interferens observeres, den individuelle konklusion på en U-SENS™-analyseserie betragtes som POSITIV (herefter P).

— En U-SENS™-forudsigelse betragtes som NEGATIV, hvis mindst to uafhængige analyseserier er negative (N) (figur 1). Hvis de to første analyseserier begge er negative (N), betragtes U-SENS™-forudsigelsen som NEGATIV, og en tredje analyseserie er unødvendig.

— En U-SENS™-forudsigelse betragtes som POSITIV, hvis mindst to uafhængige analyseserier er positive (P) (figur 1). Hvis de to første analyseserier begge er positive (P), betragtes U-SENS™-forudsigelsen som POSITIV, og en tredje analyseserie er unødvendig.

— Da der ikke foretages et dosisbestemmelsesassay, er der en undtagelse, hvis SI for CD86 i første analyseserie er højere end eller lig med 150 % udelukkende ved den højeste ikke-cytotoksiske koncentration. Analyseserien betragtes i dette tilfælde som ikke entydig (NC), og yderligere koncentrationer (mellem den højeste ikke-cytotoksiske koncentration og den laveste cytotoksiske koncentration – jf. punkt 20) bør testes i supplerende analyseserier. Hvis en analyseserie påvises som NC, bør der foretages mindst to ekstra analyseserier, og en fjerde analyseserie, hvis forsøg 2 og 3 ikke er overensstemmende (N og/eller P) (figur 1). Opfølgende analyseserier vil blive betragtet som positive, selv hvis en af de ikke-cytotoksiske koncentrationer giver en CD86-værdi på eller over 150 %, eftersom koncentrationen er blevet tilpasset det specifikke testkemikalie. Den endelige forudsigelse baseres på flertalsresultatet af de tre eller fire individuelle analyseserier (dvs. to ud af tre eller to ud af fire) (figur 1).

▼**M8**



Figur 1: Den forudsigelsesmodel, der anvendes i U-SENS™-testen. En U-SENS™-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 4 og punkt 7, 8 og 9 i den generelle indledning.

N: Analyseserie med ingen CD86 positiv eller interferens observeret.

P: Analyseserie med CD86 positiv og/eller interferens observeret.

NC: Ikke entydig. Første analyseserie med Ikke entydig, hvor CD86 udelukkende er positiv ved den højeste ikke-cytotoksiske koncentration.

#: En Ikke entydig (NC) individuel konklusion, der kun tilskrives den første analyseserie, medfører automatisk et behov for en tredje analyseserie for at opnå et flertal af positive (P) eller negative (N) konklusioner i mindst to ud af tre uafhængige analyseserier.

$: Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de tre analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de to første analyseserier vist i boksen ovenfor.

°: Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de fire analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de tre første analyseserier vist i boksen ovenfor.

Acceptkriterier

22. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når U-SENS™-testen anvendes (12):

— Efter eksponeringsperioden på 45±3 timer skulle den gennemsnitlige levedygtighed af de tre prøver af ubehandlede U937-celler være > 90 %, og ingen afvigelse i CD86-ekspressionen observeres. Den grundlæggende CD86-ekspression af ubehandlede U937-celler skulle ligge i intervallet ≥ 2 % og ≤ 25 %.

▼M8

— Når DMSO anvendes som opløsningsmiddel, vurderes gyldigheden af DMSO-bærestofkontrollen ved at beregne et DMSO SI sammenlignet med ubehandlede celler, og den gennemsnitlige levedygtighed af celler i de tre prøver skulle være > 90 %. DMSO-bærestofkontrollen er gyldig, hvis middelværdien af dens tre CD86 SI var lavere end 250 % af middelværdien for de tre CD86 SI af ubehandlede U937-celler.

— Analyseserierne betragtes som gyldige, hvis mindst to ud af tre IgG1-værdier for ubehandlede U937-celler lå inden for intervallet ≥ 0,6 % og < 1,5 %.

— Den samtidigt gennemførte negative kontrol (mælkesyre) betragtes som gyldig, hvis mindst to ud af tre replikater var negative (CD86 SI < 150 %) og ikke-cytotoksiske (cellelevedygtighed ≥ 70 %).

— Den positive kontrol (TNBS) betragtes som gyldig, hvis mindst to ud af tre replikater var positive (CD86 SI ≥ 150 %) og ikke-cytotoksiske (cellelevedygtighed ≥ 70 %).

Testrapport

23. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, opløselighed i komplet medium, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

— fysisk udseende, opløselighed i komplet medium, DMSO-opløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

▼**M8**

Kontrol

Positiv kontrol

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien, hvis det er relevant.

Negativ kontrol og opløsningsmiddel-/bærestofkontrol

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— beskrivelse af den anvendte test

— anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)

— den anvendte flowcytometri (f.eks. model), herunder de anvendte instrumentindstillinger, antistoffer og den anvendte cytotoksicitetsmarkør

— den procedure, der er blevet anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden via testning af kompetencestoffer, og den metode, der er blevet anvendt til at påvise reproducerbare resultater over tid, f.eks. historiske kontroldata og/eller historiske reaktivitetskontroldata.

Acceptkriterier for testen

— cellelevedygtighed og CD86 SI-værdier opnået ved opløsningsmiddel-/bærestofkontrol sammenlignet med acceptintervallerne

▼M8

— cellelevedygtighed og SI-værdier opnået ved den positive kontrol sammenlignet med acceptintervallerne

— cellelevedygtighed ved alle de testede koncentrationer af det testede kemikalie.

Forsøgsmetode

— antal anvendte analyseserier

— koncentrationer af testkemikaliet, anvendt påførsels- og eksponeringstid (hvis en anden end den anbefalede)

— eksponeringens varighed

— beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

— tabulering af data, herunder CV70 (hvis muligt), SI, cellelevedygtighedsværdier, EC150-værdier (hvis muligt), opnået for testkemikaliet og for den positive kontrol i hver enkelt analyseserie, og en angivelse af klassificeringen af testkemikaliet i forhold til forudsigelsesmodellen

— beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

— diskussion af de resultater, der er opnået med U-SENS™-testen

— vurdering af testresultaterne inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusioner

LITTERATUR

(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) EC EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN doi 10.2 787/8157 37. Tilgængelig på: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Tilgængelig på: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Udkast til vejledende dokument: 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. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), s. 33 ff. Tilgængelig på:[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. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations (UN) (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. Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Tillæg 2.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af betydning (15).

CD86-koncentration/respons: Der forekommer koncentrationsafhængighed (eller koncentration/respons), når en positiv koncentration (CD86 SI ≥ 150) efterfølges af en koncentration med en stigende CD86 SI.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV70: Den anslåede koncentration, der viser en cellelevedygtighed på 70 %.

Afvigelse: En afvigelse defineres ved i) den korrigerede %$CD86^+$-værdi af det ubehandlede kontrolreplikat 3 er mindre end 50 % af den gennemsnitlige korrigerede %$CD86^+$-værdi for de ubehandlede kontrolreplikater 1 og 2, og ii) den korrigerede %$CD86^+$-værdi af det negative kontrolreplikat 3 er mindre end 50 % af den gennemsnitlige korrigerede %$CD86^+$-værdi for de negative kontrolreplikater 1 og 2.

EC150: De anslåede koncentrationer, der giver 150 % SI for CD86-ekspression.

Flowcytometri: En cytometrisk teknik, i hvilken celler opslæmmet i en væske flyder en ad gangen gennem et fokus bestående af magnetiserende lys, som spredes i mønstre, der er karakteristiske for cellerne og deres bestanddele. Cellerne mærkes hyppigt med fluorescerende markører, så lyset først absorberes og derefter udsendes ved ændrede frekvenser.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

▼M8

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver allergifremkaldende via abiotisk omdannelse, f.eks. via oxidation.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (14).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Pålideligheden bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (14).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (14).

SI: Stimuleringsindeks. Relative værdier for det geometriske gennemsnit af fluorescensintensitet i kemisk behandlede celler sammenlignet med celler behandlet med opløsningsmiddel.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Specificiteten er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (14).

Farvebuffer: En phosphatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 5 % føtalt kalveserum.

Stof: Et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

▼M8

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (16).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig test: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål (14).

▼**M8**

Tillæg 2.2

KOMPETENCESTOFFER

Forud for den rutinemæssige brug af den test, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede U-SENS™-forudsigelse på korrekt vis for de ti stoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de CV70- og EC150-værdier, der falder ind under de respektive referenceintervaller for otte ud af de ti kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der er genereret in vitro-data af høj kvalitet med U-SENS™-forsøgsmetoden. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for U-SENS™-forsøgsmetoden (1) (8).

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til U-SENS™-testen

Kompetencestoffer	CAS RN	Fysisk form	*In vivo* forudsigelse ([1])	U-SENS Opløsningsmiddel/bærestof	U-SENS CV70-reference-interval i µg/ml ([2])	U-SENS EC150-reference-interval i µg/ml) ([3])
4-Phenylenediamin	106-50-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (stærk)	Komplet medium ([3])	<30	Positiv (≤10)
Picrylsulfonsyre	2508-19-2	Væske	Sensibiliserende stof (stærk)	Komplet medium	>50	Positiv (≤50)
Diethylmaleat	141-05-9	Væske	Sensibiliserende stof (moderat)	DMSO	10-100	Positiv (≤20)
Resorcinol	108-46-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	Komplet medium	>100	Positiv (≤50)
Kanelalkohol	104-54-1	Fast stof	Sensibiliserende stof (svag)	DMSO	>100	Positiv (10-100)
4-Allylanisol	140-67-0	Væske	Sensibiliserende stof (svag)	DMSO	>100	Positiv (<200)
Sakkarin	81-07-2	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	DMSO	>200	Negativ (>200)
Glycerol	56-81-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	Komplet medium	>200	Negativ (>200)
Mælkesyre	50-21-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	Komplet medium	>200	Negativ (>200)
Salicylsyre	69-72-7	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	DMSO	>200	Negativ (>200)

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

([1]) Forudsigelser af in vivo-fare (og -styrke) er baseret på LLNA-data (1) (8). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (17).

([2]) På baggrund af historiske observerede værdier (1) (8).

([3]) Komplet medium: RPMI-1640 medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum, 2 mM L-glutamin, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (8).

▼**M8**

Tillæg 3

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: IL-8 LUC-ASSAY

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. I modsætning til assays, der analyserer ekspressionen af celleoverflademarkører, måler IL8-Luc-assay ændringerne i IL-8-ekspressionen, et cytokin knyttet til aktiveringen af dendritiske celler (DC). I IL-8 reporter-cellelinjen udledt af THP-1 (THP-G8, fastlagt på grundlag af human akut monocytisk leukæmi-cellelinjen THP-1) måles IL-8-ekspressionen efter eksponering for sensibiliserende stoffer (1). Ekspressionen af luciferase anvendes derefter til at understøtte differentieringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

2. IL-8 Luc-assayet er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse (2) udført af det japanske center for validering af alternative metoder (JaCVAM), **økonomi-, handels- og industriministeriet** (METI), og det japanske selskab **for alternativer til dyreforsøg (JSAAE**) og efterfølgende underkastet en uafhængig peer review (3) under ledelse af JaCVAM og sundheds-, arbejds- og velfærdsministeriet (MHLW) med støtte fra **det internationale samarbejde om alternative forsøgsmetoder** (ICATM). På grundlag af al tilgængelig dokumentation og input fra myndigheder og interessenter anses IL-8 Luc-assayet for at være nyttigt som en del af IATA til støtte for differentieringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Der findes i litteraturen eksempler på anvendelsen af data fra IL-8 Luc-assayet i kombination med andre oplysninger (4) (5) (6).

3. Det viste sig, at IL-8 Luc-assayet kunne overføres til laboratorier med erfaring i celledyrkning og luciferasemåling. Reproducerbarheden inden for og mellem laboratorier var på henholdsvis 87,7 % og 87,5 % (2). Data genereret i valideringsundersøgelsen (2) og andre publicerede værker (1) (6) viser, at IL-8 Luc-assayet i modsætning til LLNA bedømte 118 ud af 143 kemikalier som positive eller negative og 25 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden af IL-8 Luc-assayet med hensyn til differentiering mellem hudsensibiliserende stoffer (UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer (UN GHS-/CLP-ingen kategori) er 86 % (101/118) med en følsomhed på 96 % (92/96) og en specificitet på 41 % (9/22). Når der ses bort fra stoffer, der ligger uden for det nedenfor beskrevne anvendelsesområde (punkt 5), bedømte IL-8 Luc-assayet 113 ud af 136 kemikalier som positive eller negative og 23 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden af IL-8 Luc-assayet er 89 % (101/113) med en følsomhed på 96 % (92/96) og en specificitet på 53 % (9/17). Ved hjælp af de i Urbisch et al. (7) nævnte humandata bedømte IL-8 Luc-assayet 76 ud af 90 kemikalier som positive eller negative og 14 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden er 80 % (61/76), følsomheden er 93 % (54/58) og specificiteten er 39 % (7/18). Når der ses bort fra stoffer, der ligger uden for anvendelsesområdet, bedømte IL-8 Luc-assayet 71 ud af 84 kemikalier som positive eller negative og 13 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden er 86 % (61/76) med en følsomhed på 93 % (54/58) og en specificitet på 54 % (7/18). Det er mere sandsynligt, at falsk negative forudsigelser i forbindelse med IL-8 Luc-assayet vil forekomme i tilknytning til kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (UN GHS-/CLP-underkategori 1B) end i tilknytning til kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (6). Samlet set fremgår det af oplysningerne, at IL-8 Luc-assayet kan bidrage til identificeringen af hudsensibiliseringsfarer. Den

▼M8

angivne nøjagtighed for IL-8 Luc-assayet som en enkeltstående test er kun vejledende, da testen bør vurderes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. Når forsøgsmetoder uden brug af dyr vurderes i tilknytning til hudsensibilisering, bør man desuden huske på, at LLNA og andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

4. På grundlag af de data, der er tilgængelige i øjeblikket, har IL-8 Luc-assayet vist sig at være relevant for testkemikalier, der omfatter en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrker (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (2) (6).

5. Selv om IL-8 Luc-assayet anvender X-VIVO™ 15 som opløsningsmiddel, bedømte det korrekt kemikalier med log K_{ow} >3,5 og kemikalier med en vandopløselighed på omkring 100 μg/ml som beregnet ved EPI Suite™, og dens kapacitet til at påvise sensibiliserende stoffer med dårlig vandopløselighed er bedre end for IL-8 Luc-assayet, der anvender dimethylsulfoxid (DMSO) som opløsningsmiddel (2). De negative resultater for testkemikalier, der ikke er opløst ved 20 mg/ml, kan dog medføre falsk negative resultater på grund af den manglende evne til at opløses i X-VIVO™ 15. De negative resultater for disse kemikalier bør derfor ikke tages i betragtning. Der sås en høj andel af falske negativer for anhydrider i valideringsundersøgelsen. På grund af cellelinjens begrænsede metaboliske kapacitet (8) og testbetingelserne kan pro-haptener (stoffer, der kræver metabolisk aktivering) og præ-haptener (stoffer, der aktiveres ved oxidation) desuden give negative resultater i assayet. Selv om de negative resultater for stoffer, der mistænkes for at være præ-/pro-haptener, skal fortolkes med forsigtighed, bedømte IL-8 Luc-assayet imidlertid 11/11 præ-haptener, 6/6 pro-haptener, og 6/8 præ-/pro-haptener i IL-8 Luc-assay-datasættet korrekt (2). På grundlag af den seneste detaljerede gennemgang af tre forsøg uden brug af dyr (DPRA, KeratinoSens™ og h-CLAT) til påvisning af præ- og pro-haptener (9), og på grundlag af den omstændighed, at THP-G8-celler, der anvendes i IL-8 Luc-assayet er en cellelinje, der er udledt af THP-1, som anvendes i h-CLAT, kan IL-8 Luc-assayet også bidrage til at øge følsomheden af forsøg uden brug af dyr og til at påvise præ- og pro-haptener i kombination med andre test. De overfladeaktive stoffer, der er blevet testet indtil videre, gav (falsk) positive resultater uanset deres type (f.eks. kationaktiv, anionaktiv eller nonionaktiv). Endelig kan kemikalier, der interfererer med luciferase, maskere dets aktivitet/måling, hvilket forårsager en tydelig inhibering eller øget luminescens (10). Eksempelvis findes der rapporter om, at fytoøstrogenkoncentrationer på over 1μM forstyrrede luminescenssignalerne i andre luciferasebaserede reportergenassays på grund af overaktivering af luciferasereportergenet. Som følge heraf skal den luciferaseekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller forbindelser, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende aktivering af luciferasereportergenet, undersøges nøje (11). Det fremgår af det ovenstående, at overfladeaktive stoffer, anhydrider og kemikalier, der interfererer med luciferase, ligger uden for anvendelsesområdet for dette assay. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at IL-8 Luc-assayet ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.

6. Som beskrevet ovenfor understøtter IL-8 Luc-assayet differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Der er behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, med henblik på at bestemme, om IL-8 Luc-resultaterne kan bidrage til styrkevurderingen, når den betragtes i kombination med andre informationskilder.

▼M8

7. Definitioner findes i tillæg 3.1.

PRINCIP FOR TESTEN

8. IL-8 Luc-assayet anvender en human monocytisk leukæmi-cellelinje, THP-1, der er erhvervet fra American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Ved hjælp af denne cellelinje udviklede afdelingen for dermatologi, Tohoku University School of Medicine, en THP-1-udledt IL-8 reporter-cellelinje, THP-G8, der indeholder henholdsvis Stable Luciferase Orange (SLO) og Stable Luciferase Red (SLR) luciferasegenerne under kontrol af IL-8- og glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase (GAPDH)- aktivatorer (1). Dette giver mulighed for kvantitativ måling af luciferasegeninduktion ved hjælp af veldokumenterede lysproducerende luciferasesubstrater som en indikator for aktiviteten af IL-8 og GAPDH i celler efter eksponering for sensibiliserende kemikalier.

9. Assaysystemet med to farver omfatter luciferase, der udsender orange lys (SLO; λmax = 580 nm) (12) for genekspressionen af IL-8-aktivatoren, og luciferase, der udsender rødt lys (SLR; λmax = 630 nm) (13) for genekspressionen af den interne kontrolaktivator, GAPDH. De to luciferaser udsender forskellige farver, når de reagerer med firefly d-luciferin, og deres luminescens måles samtidigt i en et-trinsreaktion ved at dele emissionen fra assayblandingen ved hjælp af et optisk filter (14) (tillæg 3.2).

10. THP-G8-cellerne behandles med testkemikaliet i 16 timer, hvorefter SLO luciferaseaktiviteten (SLO-LA), der afspejles i IL-8-aktivatoraktiviteten, og SLR luciferaseaktiviteten (SLR-LA), der afspejles i GAPDH-aktivatoraktiviteten, måles. For at gøre forkortelserne letforståelige betegnes SLO-LA og SLR-LA som henholdsvis IL8LA og GAPLA. Tabel 1 indeholder en beskrivelse af de udtryk, der er knyttet til luciferaseaktiviteten i IL-8 Luc-assayet. De målte værdier anvendes til at beregne den standardiserede IL8LA-værdi (nIL8LA), som er forholdet mellem IL8LA og GAPLA; induktionen af nIL8LA (Ind-IL8LA), der er forholdet mellem det aritmetiske gennemsnit af firdobbelt-målte værdier for nIL8LA i THP-G8-celler behandlet med et testkemikalie og værdierne for nIL8LA i ubehandlede THP-G8-celler; og inhiberingen af GAPLA (Inh-GAPLA), der er forholdet mellem det aritmetiske gennemsnit af firdobbelt-målte værdier for GAPLA i THP-G8-celler behandlet med et testkemikalie og værdierne for GAPLA i ubehandlede THP-G8-celler, og anvendes som en indikator for cytotoksisk effekt.

Tabel 1

Beskrivelse af de udtryk, der er knyttet til luciferaseaktiviteten i IL-8 Luc-assayet

Forkortelser	Definition
GAPLA	SLR luciferaseaktivitet, der afspejler GAPDH-aktivatoraktiviteten
IL8LA	SLO luciferaseaktivitet, der afspejler IL-8-aktivatoraktiviteten
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA i THP-G8-celler behandlet med kemikalier/nIL8LA i ubehandlede celler

▼**M8**

Forkortelser	Definition
Inh-GAPLA	GAPLA i THP-G8-celler behandlet med kemikalier/GAPLA i ubehandlede celler
CV05	Den laveste koncentration af kemikaliet, ved hvilken Inh-GAPLA bliver < 0,05.

11. Der stilles ydeevnestandarder (15) til rådighed for at lette valideringen af ændrede in vitro-IL-8-luciferaseforsøg svarende til IL-8 Luc-assayet og for at muliggøre en rettidig ændring af OECD-testvejledning 442E, så de kan medtages. OECD's Mutual Acceptance of Data (MAD) vil kun være garanteret for forsøg, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse test er gennemgået og medtaget i OECD-testvejledning 442E (16).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

12. Forud for den rutinemæssige brug af det forsøg, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de ti kompetencestoffer, der er opført i tillæg 3.3. i overensstemmelse med Good *in vitro* Method Practices (17). Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 15) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 21-24), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

FREMGANGSMÅDE

13. Der foreligger standardprocedurer (SOP) for IL-8 Luc-assayet, og de bør anvendes ved udførelsen af testen (18). Laboratorier, der er villige til at udføre testen, kan erhverve recombinant THP-G8-cellelinjerne fra GPC Lab. Co.Ltd., Tottori, Japan, når de har underskrevet en materialeoverførselsaftale (MTA) i overensstemmelse med betingelserne i OECD-skabelonen. Følgende punkter indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og fremgangsmåder i assayet.

Præparering af celler

14. THP-G8-cellelinjen fra GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, bør anvendes til udførelse af IL-8 Luc-assayet (jf. punkt 8 og 13). Ved modtagelsen opformeres cellerne (f.eks. 2-4 opformeringer) og opbevares frosne som en homogen stamme. Celler fra denne stamme kan opformeres højst 12 gange eller i højst seks uger. Det medium, der anvendes til opformering, er RPMI-1640 dyrkningsmedium indeholdende 10 % føtalt kalveserum (FBS), antibiotika-/antimykotikumopløsning (100U/ml penicillin G, 100µg/ml streptomycin og 0,25 µg/ml amfotericin B i 0,85 % fysiologisk saltopløsning) (f.eks. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (f.eks. CAS:58-58-2) og 300 µg/ml G418 (f.eks. CAS:108321-42-2).

15. Inden cellerne anvendes til testning, bør de valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Denne kontrol bør foretages 1-2 uger eller 2-4 generationer efter optøning ved hjælp af den positive kontrol, 4-nitrobenzylbromid (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % renhed) og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85 % renhed). 4-NBB bør give en positiv respons på Ind-IL8LA (≥1.4), mens mælkesyre bør give en negativ respons på Ind-IL8LA (< 1,4). Kun celler, der består reaktivitetskontrollen, anvendes til assayet. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 22-24.

▼M8

16. Når THP-G8-cellerne skal anvendes til testning, podes de ved en tæthed på 2 til 5 × 10^5 celler/ml, og forkultiveres i dyrkningsflasker i 48-96 timer. På dagen for gennemførelse af testen vaskes celler høstet fra dyrkningsflasken med RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS uden nogen antibiotika, og genopslæmmes derefter med RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS uden nogen antibiotika ved 1 × 10^6 celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet sort 96-brønds plade (f.eks. Costar Cat#3603) med 50 µl (5 × 10^4 celler/brønd).

Fremstilling af testkemikalie og kontrolstoffer

17. Testkemikaliet og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. I forbindelse med IL-8 Luc-assayet opløses testkemikalierne i X-VIVO™ 15, et kommercielt tilgængeligt serumfrit medium (Lonza, 04-418Q), til slutkoncentrationen på 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 tilsættes til 20 mg af testkemikaliet (uanset kemikaliets opløselighed) i et mikrocentrifugerør, og der fyldes op til et volumen på 1 ml, hvorefter der omrystes kraftigt, og der rystes i en rotor ved en maksimumshastighed på 8 o/min. i 30 min. ved rumtemperatur på omkring 20°C. Hvis kemikalier i fast form fortsat er uopløselige, ultralydsbehandles de desuden, indtil kemikaliet er opløst fuldstændigt eller er stabilt dispergeret. Når testkemikalierne er opløselige i X-VIVO™ 15, fortyndes opløsningen med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 og anvendes som en X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikaliet (4 mg/ml). Når testkemikalierne ikke er opløselige i X-VIVO™ 15, rystes blandingen igen i rotoren i mindst 30 min., hvorefter den centrifugeres ved 15000 o/min. (≈20000*g*) i 5 min. Den fremkaldte supernatant anvendes som en X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikaliet. Hvis der benyttes andre opløsningsmidler som f.eks. DMSO, vand eller dyrkningsmediet, bør der fremlægges tilstrækkeligt videnskabeligt belæg for dette. Den detaljerede procedure for opløsning af kemikalier fremgår af tillæg 3.5. De X-VIVO™ 15-opløsninger, der er beskrevet i punkt 18-23, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede sorte 96-brønds plade (jf. punkt 16).

18. Den første analyseserie er beregnet til at bestemme den cytotoksiske koncentration og undersøge kemikaliernes hudsensibiliserende potentiale. Ved hjælp af X-VIVO™ 15 foretages der seriefortyndinger af X-VIVO™ 15 stamopløsningerne af testkemikalierne med en fortyndingsfaktor to (jf. tillæg 3.5) ved hjælp af en 96-brønds blok (f.eks. Costar Cat#EW-01729-03). Derefter tilsættes 50 µl/brønd fortyndet opløsning til 50 µl af cellesuspensionen i en fladbundet sort 96-brønds plade. Når testkemikalierne er opløselige i X-VIVO™ 15, ligger slutkoncentrationerne for testkemikalierne i intervallet fra 0,002 til 2 mg/ml (tillæg 3.5). Når testkemikalierne ikke er opløselige i X-VIVO™ 15 ved 20 mg/ml, anvendes kun fortyndingsfaktorer i intervallet fra 2 til 2^{10}, selv om de faktiske slutkoncentrationer af testkemikaliet forbliver usikre og afhænger af den mættede koncentration af testkemikalierne i X-VIVO™ 15 stamopløsningen.

19. I de efterfølgende analyseserier (dvs. det andet, tredje og fjerde replikat) laves X-VIVO™ 15 stamopløsningen i en koncentration, der er fire gange højere end koncentrationen for cellelevedygtighed 05 (CV05; den laveste koncentration, ved hvilken Inh-GAPLA bliver < 0,05) i det første forsøg. Hvis Inh-GAPLA ikke falder under 0,05 ved den højeste koncentration i den første analyseserie, laves X-VIVO™ 15 stamopløsningen som den højeste koncentration ved første analyseserie. Koncentrationen af CV05 beregnes ved at dividere koncentrationen af stamopløsningen i første analyseserie med fortyndingsfaktoren for CV05 (X) (fortyndingsfaktor CV05 (X); den fortyndingsfaktor, der er nødvendig for at fortynde stamopløsningen til CV05) (jf. tillæg 3.5). For testkemikalier, der ikke er opløselige i X-VIVO ved 20 mg/ml, fastsættes CV05 som koncentrationen af stamopløsningen × 1/X. Til 2.-4. analyseserie fremstilles en ny stamopløsning på 4 × CV05 (tillæg 3.5).

▼**M8**

20. Seriefortyndinger af X-VIVO™ 15 anden stamopløsning foretages med en fortyndingsfaktor på 1,5 ved hjælp af en 96-brønds blok. Derefter tilsættes 50 µl/brønd fortyndet opløsning til 50 µl af cellesuspensionen i brøndene i en fladbundet sort 96-brønds plade. Hver enkelt koncentration af hvert testkemikalie bør testes i fire brønde. Prøverne blandes derefter på en pladeryster og inkuberes i 16 timer ved 37°C og 5 % CO_2, hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet nedenfor.

21. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel er blandingen af 50 µl/brønd af X-VIVO™ 15 og 50 µl/brønd af cellesuspensionen i RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS.

22. Den anbefalede positive kontrol er 4-NBB. 20 mg af 4-NBB fremstilles i et 1,5-ml mikrocentrifugeglas, hvortil der tilsættes X-VIVO™ 15 op til 1 ml. Glasset omrystes kraftigt, og der rystes i en rotor ved en maksimumshastighed på 8 o/min. i mindst 30 min. Efter centrifugering ved 20000g i 5 min. fortyndes supernatanten med en faktor 4 med X-VIVO™ 15, og 500 µl af den fortyndede supernatant overføres til en 96-brønds blok. Den fortyndede supernatant fortyndes med X-VIVO™ 15 med faktorer på 2 og 4, og 50 µl af opløsningen tilsættes til 50 µl af THP-G8-cellesuspensionen i brøndene i den fladbundede 96-brønds plade (tillæg 3.6). Hver enkelt koncentration af den positive kontrol bør testes i fire brønde. Pladen rystes på en pladeryster og inkuberes i en CO_2 inkubator i 16 timer (37°C, 5 % CO_2), hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet i punkt 29.

23. Den anbefalede negative kontrol er mælkesyre LA. 20 mg af mælkesyren fremstilles i et 1,5-ml mikrocentrifugeglas, hvortil der tilsættes X-VIVO™ 15 op til 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml af mælkesyreopløsningen fortyndes med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). 500 µl af denne 4 mg/ml mælkesyreopløsning overføres til en brønd i en 96-brønds blok. Denne opløsning fortyndes med en faktor 2 med X-VIVO™ 15 og fortyndes derefter igen med en faktor 2 for at opnå 2 mg/ml og 1 mg/ml opløsninger. 50 µl af disse tre opløsninger og bærestofkontrollen (X-VIVO™ 15) tilsættes til 50 µl af THP-G8-cellesuspensionen i brøndene i den fladbundede sorte 96-brønds plade. Hver enkelt koncentration af den negative kontrol testes i fire brønde. Pladen rystes på en pladeryster og inkuberes i en CO_2 inkubator i 16 timer (37°C, 5 % CO_2), hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet i punkt 29.

24. Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien.

25. Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at forsegle pladerne inden inkubation med testkemikalierne.

26. De negative testkemikalier og kontrolkulturen med opløsningsmiddel kræver 2-4 analyseserier, for at der kan udledes en positiv eller negativ forudsigelse (jf. tabel 2). De enkelte analyseserier foretages på forskellige dage med en frisk X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikalier og uafhængigt høstede celler. Cellerne kan stamme fra den samme opformering.

▼M8

Målinger af luciferaseaktivitet

27. Luminescens måles ved hjælp af et 96-brønds mikropladeluminometer med optiske filtre, f.eks. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) og ARVO-serien (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometeret skal kalibreres for hver test for at sikre reproducerbarhed (19). Denne kalibrering kan foretages ved hjælp af rekombinante luciferaser, der udsender orange og rødt lys.

28. 100 µl opvarmet Tripluc® Luciferase assay reagens (Tripluc) overføres til hver enkelt brønd på pladen indeholdende cellesuspensionen behandlet med kemikaliet eller ubehandlet. Pladen rystes i 10 min. ved rumtemperatur på omkring 20°C. Pladen anbringes i luminometeret, så lucififeraseaktiviteten kan måles. Bioluminescensen måles i 3 sekunder uden (F0) og med (F1) det optiske filter. Anvendes der alternative indstillinger, f.eks. som følge af den anvendte luminometermodel, bør dette begrundes.

29. Parametrene for hver enkelt koncentration beregnes ud fra de målte værdier, f.eks. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA og den gennemsnitlige ±SD (standardafvigelse) for IL8LA, den gennemsnitlige ±SD for GAPLA, den gennemsnitlige ±SD for nIL8LA, den gennemsnitlige ±SD for Ind-IL8LA, den gennemsnitlige ±SD for Inh-GAPLA og 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA. Definitionerne af de parametre, der anvendes i dette punkt, findes i henholdsvis tillæg 3.1 og 3.4.

30. Forud for måling opnås farveopløsningsevnen i flerfarvede reporterassays generelt ved hjælp af detektorer (luminometer og pladelæser) udstyret med optiske filtre såsom kontrastfiltre (passage af lange eller korte bølgelængder) eller båndpasfiltre. Transmissionskoefficienterne for filtrene for hver enkelt bioluminescensignalfarve bør kalibreres forud for testning, jf. tillæg 3.2.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

31. Kriterierne for en positiv/negativ afgørelse kræver for hver analyseserie følgende:

— En IL-8 Luc-assay-forudsigelse betragtes som positiv, hvis et testkemikalie har et Ind-IL8LA ≥ 1,4, og den nedre grænse for 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA ≥ 1,0.

— En IL-8 Luc-assay-forudsigelse betragtes som negativ, hvis et testkemikalie har et Ind-IL8LA < 1,4, og/eller den nedre grænse for 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA < 1,0.

Forudsigelsesmodel

32. Testkemikalier, der giver to positive resultater i 1., 2., 3. eller 4. analyseserie, identificeres som positive, mens de testkemikalier, der giver tre negative resultater i 1., 2., 3. eller 4. analyseserie, identificeres som formodet negative (tabel 2). Blandt de formodede negative kemikalier betragtes kemikalier, der er opløst i koncentrationen 20 mg/ml i X-VIVO™ 15 som negative, mens kemikalier, der ikke er opløst i koncentrationen 20 mg/ml i X-VIVO™ 15 ikke bør tages i betragtning (figur 1).

▼M8

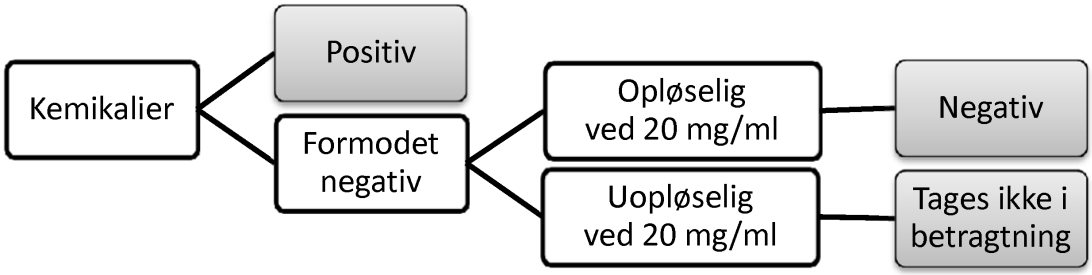
Tabel 2

Kriterier for identificering af positive og formodet negative

1. analyseserie	2. analyseserie	3. analyseserie	4. analyseserie	Endelig forudsigelse
Positiv	Positiv	–	–	Positiv
	Negativ	Positiv	–	Positiv
		Negativ	Positiv	Positiv
			Negativ	Formodet negativ
Negativ	Positiv	Positiv	–	Positiv
		Negativ	Positiv	Positiv
			Negativ	Formodet negativ
	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv
			Negativ	Formodet negativ
		Negativ	–	Formodet negativ

Figur 1

Forudsigelsesmodel for den endelige bedømmelse



Acceptkriterier

33. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når IL-8 Luc-assayet anvendes:

— Ind-IL8LA bør være over 5,0 ved mindst en koncentration af den positive kontrol, 4-NBB, i hver enkelt analyseserie.

— Ind-IL8LA bør være under 1,4 ved enhver koncentration af den negative kontrol, mælkesyre, i hver enkelt analyseserie.

— Data fra plader, for hvilke GAPLA i kontrolbrøndene med celler og Tripluc, men uden kemikalier er mindre end 5 gange værdien for en brønd, der kun indeholder testmedium (50 µl/brønd RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS og 50 µl/brønd X-VIVO™ 15), bør forkastes.

— Data fra plader, for hvilke Inh-GAPLA for alle koncentrationer af test- eller kontrolkemikalierne er mindre end 0,05, bør kasseres. I dette tilfælde bør den første test gentages, så den højeste koncentration af den gentagne test er den laveste slutkoncentration for den foregående test.

▼**M8**

Testrapport

34. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalier

Stof med kun én bestanddel:

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opløselighed i X-VIVO™ 15. For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15, uanset om der ses bundfald eller flotation efter centrifugering

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier, hvis X-VIVO™ 15 ikke er blevet anvendt.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt

— molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opløselighed i X-VIVO™ 15. For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15, uanset om der ses bundfald eller flotation efter centrifugering

— testede koncentrationer

— opbevaringsforhold og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier, hvis X-VIVO™ 15 ikke er blevet anvendt.

Kontrol

Positiv kontrol:

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

— fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant

▼**M8**

— renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— testede koncentrationer

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserie, hvis det er relevant.

Negativ kontrol:

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer

— renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.

— fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre negative kontroller end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt

— opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

— navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen

— beskrivelse af den anvendte test

— anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)

— partinummer og oprindelse af FBS, leverandørnavn, partinummer på den sorte 96-brønds fladbundede plade og partinummer på Tripluc-reagensen

— opformeringsnummer og den celletæthed, der er anvendt til testning

— den anvendte celletællingsmetode til opformering inden testen, og de foranstaltninger, der er truffet for at sikre en homogen cellefordeling

— Det anvendte luminometer (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, det anvendte luciferasesubstrat og dokumentation for hensigtsmæssige luminescensmålinger baseret på den kontrol, der er beskrevet i tillæg 3.2

— den fremgangsmåde, der er anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved testning af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Forsøgsmetode

— antal replikater og foretagne analyseserier

— koncentrationer af testkemikaliet, tilsætningsprocedure og eksponeringstid (hvis forskellig fra det anbefalede)

▼**M8**

— beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier

— beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier

— beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

— målinger af IL8LA og GAPLA

— beregninger af nIL8LA, Ind-IL8LA og Inh-GAPLA

— 95 % konfidensinterval for Ind-IL8LA

— en graf, der viser dosis/respons-kurver for induktion af luciferaseaktivitet og levedygtighed

— beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultater

— diskussion af de resultater, der er opnået med IL-8 Luc-assayet

— vurdering af resultaterne af assayet inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

LITTERATUR

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K og 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 og Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: 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. Tilgængelig på: 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 og 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 og Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N og Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation test: 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 og 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 og 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 og 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, og Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, og 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 og 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). Publiceres senere - 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. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Tilgængelig på: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, og Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) De Forenede Nationer, 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 Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Tillæg 3.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo -resultat af betydning (20).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV05: Cellelevedygtighed 05, dvs. den minimumskoncentration, ved hvilken kemikalier viser mindre end 0,05 af Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til Ind-IL8LA. Jf. definitionen af Ind-IL8LA.

GAPLA: Luciferaseaktiviteten i stabil luciferaserød (SLR) (λmaks. = 630 nm), reguleret af GAPDH-vækstfremmeren, viser cellelevedygtigheden og det levedygtige celleantal.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

II-SLR-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til Inh-GAPLA. Jf. definitionen af Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukin-8): et cytokin udledt af endotele celler, fibroblaster, keratinocyter, makrofager og monocyter, der forårsager kemotaksi af neutrofiler og T-cellelymfocytter.

IL8LA: Luciferaseaktiviteten i stabil luciferaseorange (SLO) (λmaks. = 580 nm), reguleret af IL-8-promoteren.

Ind-IL8LA: Foldinduktion for nIL8LA. Denne værdi opnås ved at dividere nIL8LA for THP-G8-celler behandlet med kemikalier med nIL8LA for ikke-stimulerede THP-G8-celler og betegner kemikaliers induktion af IL-8-promoteraktivitet.

Inh-GAPLA: Inhibering af GAPLA. Opnås ved at dividere GAPLA for THP-G8 behandlet med kemikalier med GAPLA for ubehandlede THP-G8 og betegner kemikaliers cytotoksiske effekt.

Minimumsinduktionstærskel (MIT): Den laveste koncentration, ved hvilken et kemikalie opfylder de positive kriterier.

▼M8

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en af hovedbestanddelene er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

nIL8LA: SLO luciferaseaktiviteten, der afspejler IL-8-promoteraktiviteten (IL8LA) standardiseret ved hjælp af SLR luciferaseaktiviteten, der afspejler GAPDH-promoteraktiviteten (GAPLA). Denne værdi betegner IL-8-promoteraktiviteten efter hensyntagen til cellelevedygtigheden eller celleantallet.

nSLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til nIL8LA. Jf. nIL8LA for en definition.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver sensibiliserende stoffer via abiotisk omdannelse.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (16).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Pålideligheden bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (16).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (16).

SLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til IL8LA. Jf. definitionen af IL8LA.

SLR-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til GAPLA. Jf. definitionen af GAPLA.

▼M8

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Specificiteten er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (16).

Stof: Kemiske stoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Afspændingsmiddel: Også kaldet for overfladeaktivt stof. Dette stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge ind i faste stoffer. Det kaldes også for befugtningsmiddel. (TG437)

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne metode.

THP-G8: En IL-8-reportercellelinje, der anvendes i IL-8 Luc-assayet. Den humane makrofaglignende cellelinje THP-1 blev transfekteret med henholdsvis SLO og SLR luciferasegener under kontrollen af IL-8- og GAPDH-promotere.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (21).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål.

▼**M8**

Tillæg 3.2

PRINCIP FOR MÅLING AF LUCIFERASEAKTIVITETEN OG BESTEMMELSE AF OPTISKE FILTRES TRANSMISSIONSKOEFFICIENTER FOR SLO OG SLR

MultiReporter Assay System – Tripluc – kan anvendes sammen med et luminometer af mikropladetypen med et flerfarvepåvisningssystem, der kan forsynes med et optisk filter (f.eks. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Det optiske filter, der anvendes til måling, er 600–620 nm filter, der tillader passage af lange eller korte bølgelængder, eller 600–700 nm båndpasfiltre.

Måling af tofarvede luciferaser med et optisk filter

Dette er et eksempel på brug af Phelios AB-2350 (ATTO). Dette luminometer er udstyret med et 600 nm filter, der tillader passage af lange bølgelængder (R60 HOYA Co.), 600 nm LP (filter 1) til opsplitning af SLO (λmaks. = 580 nm) og SLR (λmaks. = 630 nm) luminescens.

Med henblik på at bestemme transmissionskoefficienterne for 600 nm LP måles først ved hjælp af rensede SLO og SLR luciferaseenzymer i) SLO- og SLR-bioluminescensintensiteten uden filter (F0), ii) SLO og SLR bioluminescensintensiteten, der passerede igennem 600 nm LP (filter 1), og derefter iii) beregnes transmissionskoefficienterne for 600 nm LP til SLO og SLR som anført nedenfor.

Transmissionskoefficienter		Forkortelse	Definition
SLO $=\kappa O_{R60}$	Filter 1 Filterets		Transmissions-koefficienter transmissions-koefficient for SLO
SLR κR_{R60}	Filter 1 Filterets		Transmissions-koefficienter transmissions-koefficient for SLR

Når intensiteten af SLO og SLR i prøven defineres som henholdsvis O og R, beskrives i) intensiteten af lys uden filter (alle optiske) F0 og ii) intensiteten af lys, der udsendes via 600 nm LP (filter 1) F1, som nedenfor.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Disse formler kan omformuleres således:

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

Ved hjælp af de beregnede transmissionskoefficienter (κO_{R60} og κR_{R60}) og de målte F0 og F1, kan du beregne O- og R-værdien som følger:

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

▼**M8**

Materialer og metoder til bestemmelse af transmissionskoefficient

1) *Reagenser*

Enkelte rensede luciferaseenzymer:

Lyofiliseret renset SLO enzym

Lyofiliseret renset SLR enzym

(som i forbindelse med valideringsarbejdet blev anskaffet fra GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan med cellelinje THP-G8)

Assay reagens:

Tripluc® Luciferase assay reagens (f.eks. fra TOYOBO Cat#MRA-301)

Medium: til luciferase assay (30 ml, opbevaret ved 2-8 °C)

Reagens	Konc.	Slutkonc. i medium	Krævet mængde
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Fremstilling af enzymopløsning*

Opløs lyofiliseret renset luciferaseenzym i et reagensglas ved at tilsætte 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl eller Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) suppleret med 10 % (w/v) glycerol, del enzymopløsningen i 10 µl delprøver i 1,5 ml engangsrør, og opbevar dem i en fryser ved -80 °C. Den nedfrosne enzymopløsning kan anvendes i op til seks måneder. Ved brug tilsættes 1 ml af mediet til luciferase assay (RPMI-1640 med 10 % FBS) til hvert enkelt rør indeholdende enzymopløsninger (fortyndet enzymopløsning), og de opbevares på is for at forhindre deaktivering.

3) *Måling af bioluminescens*

Optø Tripluc® Luciferase assay reagens (Tripluc), og opbevar det ved rumtemperatur enten i vandbad eller ved rumtemperatur. Start luminometeret, 30 min. inden målingen påbegyndes, så fotomultiplikatoren kan stabiliseres. Overfør 100 µl af den fortyndede enzymopløsning til en sort 96-brønds plade (fladbundet) (SLO referenceprøven til #B1, #B2, #B3, SLR referenceprøven til #D1, #D2, #D3). Overfør dernæst 100 µl opvarmet Tripluc til hver enkelt brønd på pladen indeholdende den fortyndede enzymopløsning ved hjælp af en pipetman. Omryst pladen i 10 min. ved rumtemperatur (omkring 25 °C) ved hjælp af en pladeryster. Opstår der bobler i opløsningerne i brøndene, fjernes de. Anbring pladen i luminometeret, og mål luciferaseaktiviteten. Bioluminescensen måles i 3 sekunder uden (F0) og med (F1) det optiske filter.

Transmissionskoefficienten for det optiske filter blev beregnet som følger:

Transmissionskoefficient (SLO (κO_{R60})) = (#B1 af F1+ #B2 af F1+ #B3 af F1) / (#B1 af F0+ #B2 af F0+ #B3 of F0)

▼**M8**

Transmissionskoefficient (SLR (κR_{R60})) = (#D1 af F1+ #D2 af F1+ #D3 af F1) / (#D1 af F0+ #D2 af F0+ #D3 of F0)

Beregnede transmissionskoefficienter anvendes til alle målinger, der foretages ved hjælp af det samme luminometer.

Kvalitetskontrol af udstyr

De fremgangsmåder, der er beskrevet i IL-8 Luc-protokollen, bør anvendes (18).

▼M8

Tillæg 3.3

KOMPETENCESTOFFER

Forud for den rutinemæssige brug af de forsøg, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede IL-8 Luc-assay-forudsigelse for de 9 stoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå værdier, der falder inden for de respektive referenceintervaller for mindst otte ud af 9 kompetencestoffer (udvalgt til at repræsentere reaktionsintervallet for hudsensibiliseringsfare). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, og at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet samt in vitro-data af høj kvalitet, der er genereret med IL-8 Luc-assayet. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for IL-8 Luc-assayet (6) (1).

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til IL-8 Luc-assayet

Kompetencestoffer	CAS nr.	Fysisk tilstand	Opløselighed i X-VIVO15 ved 20 mg/ml	In vivo-forudsigelse ([1])	IL-8 Luc-forudsigelse ([2])	Referenceinterval (µg/ml) ([3])	
						CV_{05} ([4])	**IL-8 Luc MIT ([5])**
2,4-Dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast stof	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Ekstrem)	Positiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehyd	50-00-0	Væske	Opløseligt	Sensibiliserende stof (Stærk)	Positiv	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast stof	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Moderat)	Positiv	250-290	60-250
Ethylendiamin	107-15-3	Væske	Opløseligt	Sensibiliserende stof (Moderat)	Positiv	500-700	0,1-0,4
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Væske	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Svag)	Positiv	>2000	0,04-0,1
4-Allylanisol (Estragol)	140-67-0	Væske	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Svag)	Positiv	>2000	0,01-0,07
Streptomycinsulfat	3810-74-0	Fast stof	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2000	>2000
Glycerol	56-81-5	Væske	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Væske	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2000	>2000

Forkortelser: CAS-nr. = Registernummer i Chemical Abstracts Service.
([1]) In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (19).
([2]) På baggrund af historiske observerede værdier (1) (6).
([3]) CV_{05} og IL-8 Luc MIT blev beregnet ved hjælp af den vandopløselighed, som EPI Suite™ resulterede i.
([4]) CV_{05}: Den minimumskoncentration, ved hvilken kemikalier viser mindre end 0,05 af Inh-GAPLA.
([5]) MIT: De laveste koncentrationer, ved hvilke et kemikalie opfylder de positive kriterier.

▼M8

Tillæg 3.4

INDEKSER OG BEDØMMELSESKRITERIER

nIL8LA (nSLO-LA)

j-ende repetition (j = 1-4) af i-ende koncentration (i = 0-11) måles for henholdsvis IL8LA (SLO-LA) og GAPLA (SLR-LA). Den standardiserede IL8LA-værdi betegnes som nIL8LA (nSLO-LA) og defineres som:

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

Dette er den grundlæggende måleenhed i dette assay.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Foldstigningen for den gennemsnitlige nIL8LA (nSLO-LA) for repetition i den i-ende koncentration sammenlignet med 0-koncentrationen, Ind-IL8LA, er det primære mål for dette assay. Dette forhold kan sættes på følgende formel:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Det førende laboratorium har foreslået, at en værdi på 1,4 svarer til et positivt resultat for det testede kemikalie. Denne værdi er baseret på undersøgelsen af det førende laboratoriums historiske data. Dataforvaltningsteamet anvendte dernæst denne værdi i alle faser af valideringsundersøgelsen. Det primære resultat, Ind-IL8LA, er forholdet mellem to aritmetiske gennemsnit, som det fremgår af ligningen.

95 % konfidensinterval (95 % CI)

95 % konfidensintervallet (95 % CI) baseret på forholdet kan anses for at vise nøjagtigheden af dette primære resultat. Den nedre grænse for 95 % CI ≥ 1 indikerer, at nIL8LA ved den i-ende koncentration er betydeligt højere end ved kontrolkultur med opløsningsmiddel. 95 % CI kan fastsættes på flere måder. Vi anvendte den metode, der er kendt som Fiellers teorem, i denne undersøgelse. Dette teorem for 95 % konfidensinterval udregnes ved hjælp af følgende formel:

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

hvor

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

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

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j nIL8LA_{0j}$$

▼**M8**

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

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

er 97,5 percentilen af den centrale t-fordeling med ν af frihedsgraden, hvor

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA er forholdet mellem den gennemsnitlige GAPLA (SLR-LA)-værdi for repetitionen af den i-ende koncentration sammenlignet med den gennemsnitlige GAPLA (SLR-LA)-værdi for kontrolkulturen med opløsningsmiddel og kan sættes på følgende formel:

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

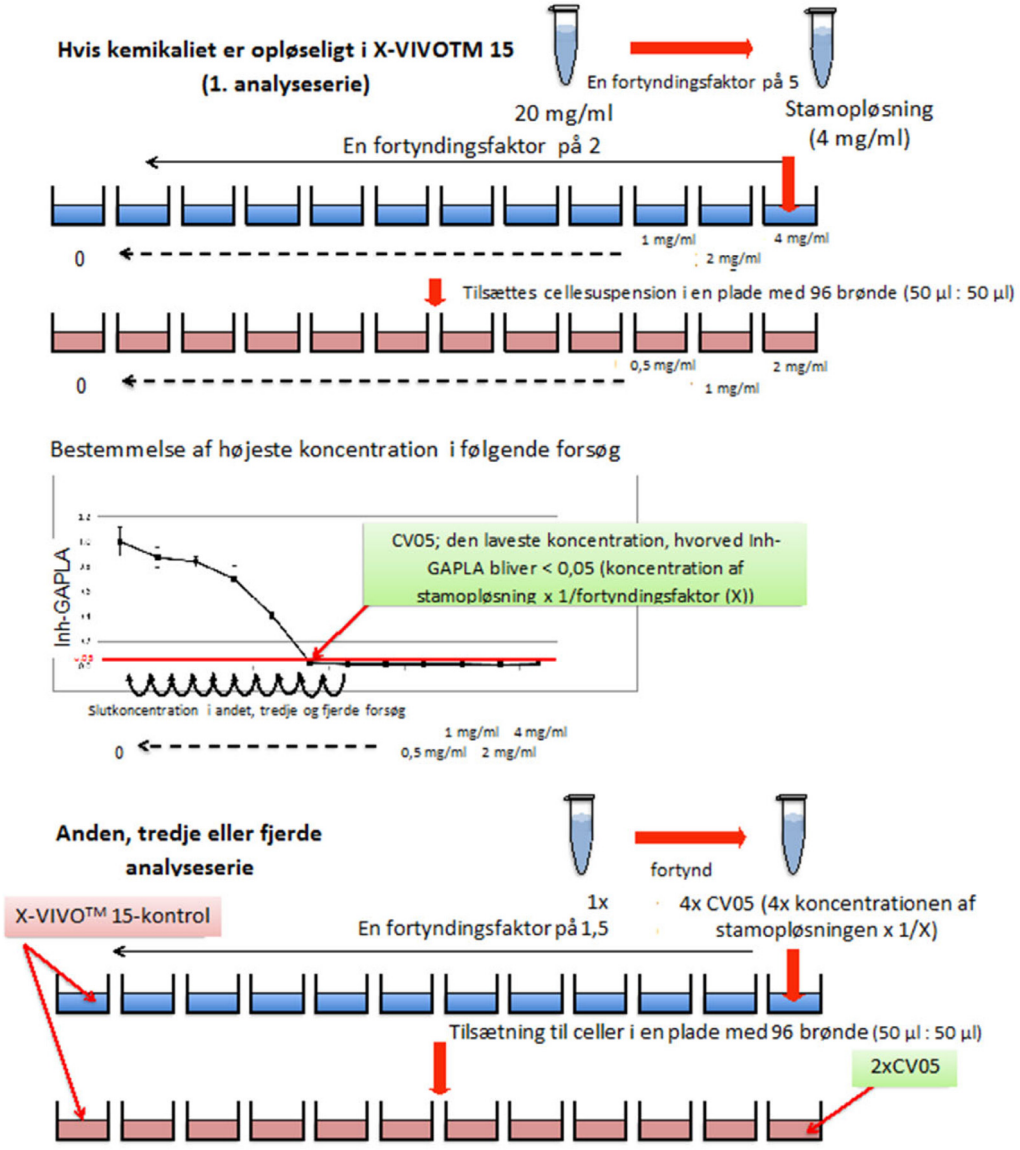
Da GAPLA er denominatoren for nIL8LA, forårsager ekstremt små værdier en stor variation i nIL8LA. Derfor kan Ind-IL8LA-værdier med ekstremt små værdier for Inh-GAPLA (under 0,05) anses for at være meget upræcise. [[G1]]

▼**M8**

Tillæg 3.5

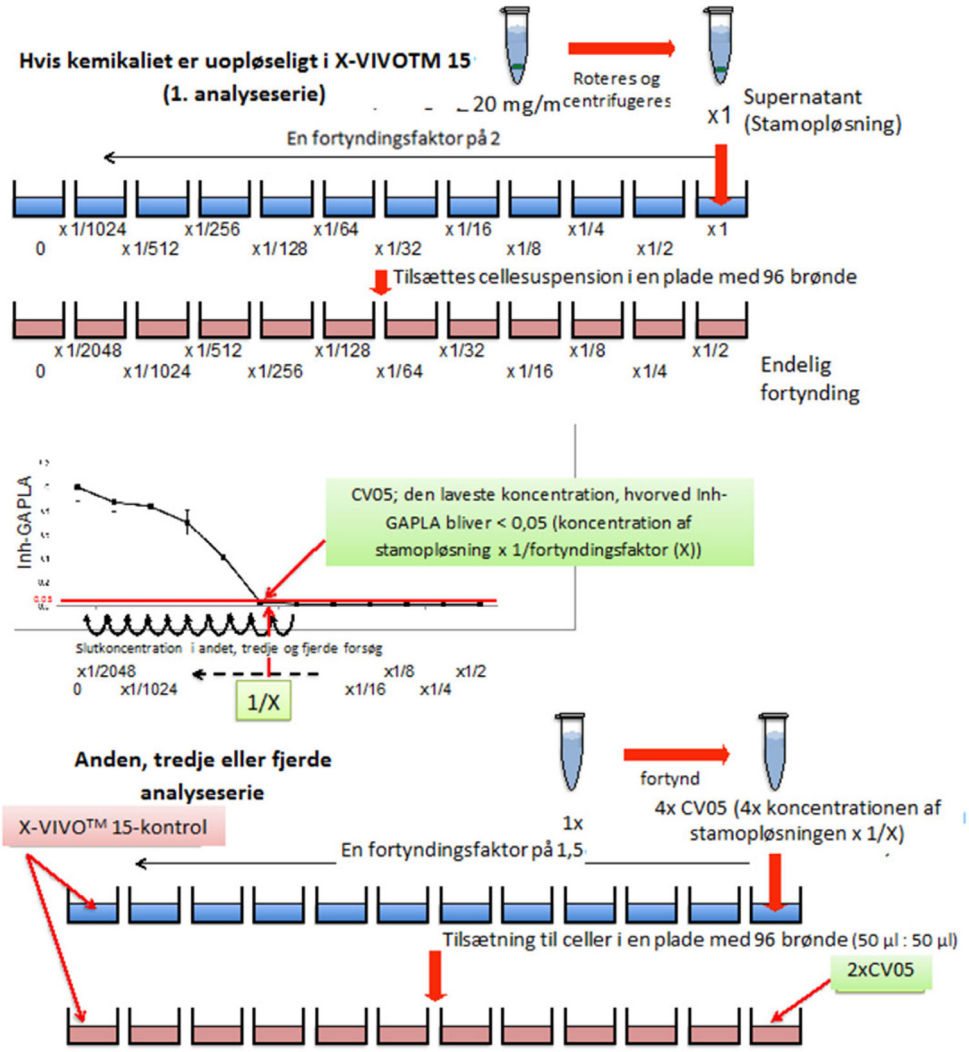
SKEMA OVER METODERNE TIL OPLØSNING AF KEMIKALIER TIL IL-8 LUC-ASSAYET

a) For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15 ved 20 mg/ml



▼**M8**

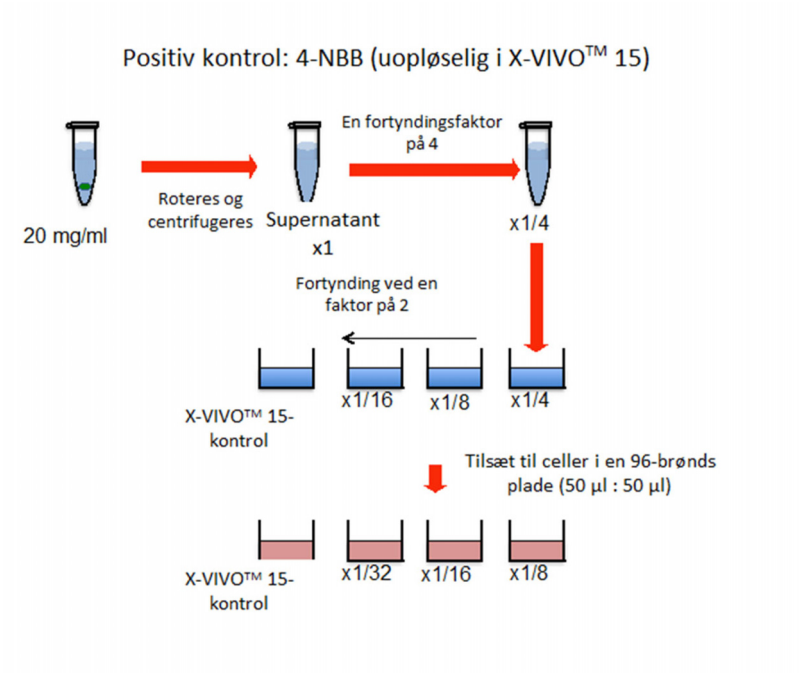
b) For kemikalier, der ikke er opløselige i X-VIVO™ 15 ved 20 mg/ml



▼**M8**

Tillæg 3.6

SKEMA OVER METODEN TIL OPLØSNING AF 4-NBB TIL DEN POSITIVE KONTROL I FORBINDELSE MED IL-8 LUC-ASSAYET



▼B

DEL C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET

INDHOLDSFORTEGNELSE

C.1.	AKUT TOKSICITET FOR FISK
C.2.	DAPHNIA SP. AKUT IMMOBILISATIONSTEST
C.3.	FERSKVANDSALGER OG CYANOBAKTERIER, VÆKSTHÆMNINGSTEST
C.4.	BESTEMMELSE AF »LET« BIONEDBRYDELIGHED
DEL I.	GENERELLE BETRAGTNINGER
DEL II.	DOC-ELIMINERING (METODE C.4-A)
DEL III.	MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST (METODE C.4-B)
DEL IV.	CO_2-UDVIKLING (METODE C.4-C)
DEL V.	MANOMETRISK RESPIROMETRI (METODE C.4-D)
DEL VI.	CLOSED BOTTLE TEST (METODE C.4-E)
DEL VII.	MITI-TEST (METODE C.4-F)
C.5.	NEDBRYDNING — BIOKEMISK OXYGENFORBRUG
C.6.	NEDBRYDNING — KEMISK OXYGENFORBRUG
C.7.	NEDBRYDNING — ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH
C.8.	TOKSICITET FOR REGNORME — TEST I SYNTETISK JORD
C.9.	BIOLOGISK NEDBRYDNING — ZAHN-WELLENS TEST
C.10.	SIMULERINGSFORSØG VEDRØRENDE AEROB SPILDEVANDSRENSNING: C.10.A: AKTIVEREDE SLAMENHEDER — C.10.B: BIOFILM
C.11.	AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST (KULSTOF- OG AMMONIUMILTNING)
C.12.	BIOLOGISK NEDBRYDNING — MODIFICERET SCAS-TEST
C.13.	BIOAKKUMULERING I FISK: EKSPONERING I VAND ELLER FØDE
C.14.	VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL
C.15.	FISK, KORTTIDSTOKSICITETSTEST PÅ *FISKEEMBRYONER* OG BLOMMESÆKYNGEL
C.16.	HONNINGBIER — AKUT ORAL TOKSICITETSTEST
C.17.	HONNINGBIER — AKUT KONTAKTTOKSICITETSTEST
C.18.	ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGTMETODE

▼B

C.19.	BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{OC}) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)
C.20.	FORMERINGSTEST FOR *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	JORDMIKROORGANISMER: KVÆLSTOFOMDANNELSESTEST
C.22.	JORDMIKROORGANISMER: KULSTOFOMDANNELSESTEST
C.23.	AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I JORD
C.24.	AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I AKVATISKE SEDIMENTSYSTEMER
C.25.	AEROB MINERALISERING I OVERFLADEVAND — SIMULERET BIONEDBRYDNINGSFORSØG
C.26.	LEMNA SP. VÆKSTHÆMNINGSTEST
C.27.	TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET SEDIMENT
C.28.	TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET VAND
C.29.	LET BIONEDBRYDELIGHED — CO_2 I LUKKEDE BEHOLDERE (HEADSPACE-TEST)
C.30.	BIOAKKUMULERING I TERRESTRISKE OLIGOCHAETER
C.31.	LANDPLANTETEST: FRØPLANTESPIRINGS- OG FRØPLANTEVÆKSTTEST
C.32.	FORMERINGSTEST — ENCHYTRAEIDER
C.33.	FORMERINGSTEST (EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)
C.34.	BESTEMMELSE AF HÆMNINGEN AF ANAEROBE BAKTERIERS AKTIVITET — REDUKTION AF GASPRODUKTION FRA AKTIVT (SPILDEVANDS)SLAM MED ANAEROB UDRÅDNING
C.35.	TOKSICITETSTEST — SEDIMENT/VAND PÅ *LUMBRICULUS* MED FORURENET SEDIMENT
C.36.	ROVMIDE (HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER) — FORMERINGSTEST I JORD
C.37.	21-DAGES ASSAY MED FISK: EN KORTTIDSSCREENINGSTEST FOR ØSTROGENE OG ANDROGENE VIRKNINGER OG AROMATASEHÆMNING
C.38.	AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY
C.39.	COLLEMBOLFORMERINGSTEST I JORD

▼B

C.40.	TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER OVER EN HEL LIVSCYKLUS MED FORURENET VAND ELLER FORURENET SEDIMENT
C.41.	TEST AF FISKS KØNSUDVIKLING
C.42.	BIONEDBRYDELIGHED I HAVVAND
C.43.	ORGANISKE STOFFERS ANAEROBE BIONEDBRYDELIGHED I UDRÅDNET SLAM: VED MÅLING AF GASPRODUKTION
C.44.	UDVASKNING I JORDSØJLER
C.45.	SKØN OVER EMISSIONER FRA KEMISK BESKYTTET TRÆ TIL MILJØET: LABORATORIEMETODE FOR TRÆVARER, DER ER I DIREKTE KONTAKT MED FERSKVAND ELLER HAVVAND
C.46.	BIOAKKUMULERING I BENTISKE OLIGOCHAETER, DER LEVER I SEDIMENT
C.47.	TOKSICITETSTEST MED FISK I DE TIDLIGE UDVIKLINGSSTADIER
C.48.	ASSAY FOR FISKS REPRODUKTION PÅ KORT SIGT
C.49.	TEST AF AKUT TOKSICITET FOR FISKEEMBRYONER (FET)
C.50.	TOKSICITETSTEST AF SEDIMENTFRI *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*
C.51.	TOKSICITETSTEST AF VANDSEDIMENTET *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*
C.52.	MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST (MEOGRT) (JAPANSK RISFISK UDVIDET ENKELTGENERATIONS REPRODUKTIONSTEST)
C.53.	LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY (LAGDA) (ASSAY FOR AMFIBIELARVERS VÆKST OG UDVIKLING)

▼B

C.1. AKUT TOKSICITET FOR FISK

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at bestemme et stofs akutte dødelige toksicitet for ferskvandsfisk. Det er ønskeligt at have flest mulige oplysninger om stoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed, når man skal vælge, med hvilken testmetode (statisk, semistatisk eller gennemløb) der mest hensigtsmæssigt kan opnås tilfredsstillende konstante koncentrationer af teststoffet under testens forløb.

Øvrige oplysninger (f.eks. strukturformel, renhedsgrad, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten) bør tages i betragtning både ved planlægningen af testen og ved fortolkningen af testresultaterne.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Akut toksicitet er erkendbar skadelig virkning, der fremkaldes hos en organisme inden for kort tid (dage) ved eksponering for et stof. I denne test udtrykkes akut toksicitet som middel dødelig koncentration (LC_{50}), dvs, den koncentration i vand, som dræber 50 % af fiskene i en forsøgsgruppe under kontinuerlig eksponering i en vis periode, som skal angives.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt pr. volumenenhed (mg/l). De kan også udtrykkes i vægtforhold (mg/kg).

1.3. REFERENCESTOFFER

Der kan anvendes et referencestof til at godtgøre, at forsøgsdyrenes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under forsøgsbetingelserne i laboratorier.

Der er ikke specificeret nogen referencestoffer til denne test.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Der kan udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om LC_{50} er større end denne koncentration.

Fiskene udsættes for teststoffet i vand i en række koncentrationer i 96 timer. Dødeligheden registreres med højst 24 timers mellemrum, og man beregner om muligt de koncentrationer, der på hvert observationstidspunkt dræber 50 % af fiskene (LC_{50}).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierne gælder for såvel grænsetesten som den komplette testmetode.

Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10 % (eller én fisk, hvis der benyttes mindre end ti fisk) ved testens afslutning.

Koncentrationen af opløst oxygen skal være højere end 60 % af mætning gennem hele testen.

▼B

Koncentrationen af teststoffet skal være op til 80 % af startkoncentrationen gennem hele testen.

For stoffer, der let opløses i testmediet og giver stabile opløsninger, dvs. stoffer, der ikke i væsentlig grad fordamper, nedbrydes, hydrolyseres eller adsorberes, kan startkoncentrationen antages at være lig med den nominelle koncentration. Det skal godtgøres, at koncentrationen har været opretholdt gennem hele testen, og at kvalitetskriterierne er opfyldt.

For stoffer, som

i) er tungt opløselige i testmediet eller

ii) kan danne stabile emulsioner eller dispersioner eller

iii) er ustabile i vandig opløsning,

skal der som værdi for startkoncentrationen anvendes den koncentration, som er målt i opløsningen (eller hvis dette ikke er teknisk muligt, målt i vandsøjlen) ved testens begyndelse. Koncentrationen bestemmes efter, at der opnået ligevægt, men førend testfisk kommes i.

I alle disse tilfælde skal yderligere målinger foretages i løbet af testen for at sikre, at koncentrationen har været opretholdt eller kvalitetskriterierne har været opfyldt.

pH må ikke variere med mere end 1 enhed.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der kan anvendes tre typer procedurer:

Statisk test:

Toksicitetstest, hvor der ikke foregår gennemløb af testopløsning. (Opløsningerne udskiftes ikke under testens forløb).

Semi-statisk test:

Test uden gennemløb af testopløsning, men hvor hele testopløsningen udskiftes med regelmæssige lange mellemrum (f.eks. hver 24. time).

Gennemstrømningstest:

Toksicitetstest, hvor vandet i testkamrene løbende udskiftes, og hvor teststoffet transporteres med udskiftnings-vandet.

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Teststofopløsninger*

Der fremstilles stamopløsninger af den påkrævede styrke ved opløsning af stoffet i deioniseret vand eller vand som beskrevet i 1.6.1.2.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningen, Hvis der testes høje koncentrationer, kan stoffet opløses direkte i det vand, der ellers anvendes til fortynding.

▼B

Stoffer testes normalt kun op til opløselighedsgrænsen, For visse stoffer (f.eks. stoffer, som er tungt opløselige i vand, som har en høj P_{ow}-værdi, eller som danner en stabil dispersion og ikke en ægte opløsning i vand) kan det accepteres, at der anvendes en testkoncentration, der er større end opløseligheden, så det sikres, at den højeste opløste/stabile koncentration er nået. Det er dog vigtigt, at denne koncentration ikke på anden måde forstyrrer testsystemet (f.eks. dannelse af en hinde af stoffet på vandoverfladen, så vandet ikke iltes, osv.).

Der kan tages ultralyd, organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler til hjælp til fremstilling af stamopløsninger af stoffer, der er tungt opløselige i vand, og til dispergering af sådanne stoffer i testmediet. Hvis der anvendes hjælpestoffer, skal alle testkoncentrationer indeholde samme mængde hjælpestof, og der anvendes en ekstra kontrolgruppe, der udsættes for samme koncentration af hjælpestoffet, som er anvendt i testserien. Sådanne hjælpestoffer anvendes i den lavest mulige koncentration, der i hvert tilfælde ikke må være større end 100 mg/l i testmediet.

Testen gennemføres uden justering af pH, Hvis der konstateres en væsentlig pH-ændring, anbefales det at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så fald justeres stamopløsningens pH til samme værdi som i det vand, der anvendes til fortynding, medmindre der er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH foretrækkes HCl og NaOH. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres væsentligt. Hvis teststoffet reagerer kemisk eller udfældes ved justeringen, rapporteres dette.

1.6.1.2. *Vand til opbevaring og fortynding*

Der kan benyttes drikkevand (ikke forurenet med potentielt skadelige koncentrationer af chlor, tungmetaller eller andre stoffer), råvand af egnet kvalitet eller kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg 1). Der foretrækkes vand med en total hårdhed mellem 10 og 250 mg/l (som $CaCO_3$) og med et pH mellem 6,0 og 8,5.

1.6.2. **Apparatur**

Alt apparatur skal være af kemisk inert materiale.

— automatisk fortyndingssystem (for gennemstrømningstest)

— oxygenmåleudstyr

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed

— passende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter.

1.6.3. **Testfisk**

Fiskene skal være i god helbredstilstand og uden synlige misdannelser.

▼B

Arterne udvælges på grundlag af praktiske kriterier såsom, om de er til rådighed hele året, hvor lette de er at holde, om de er egnede til testning, og hvor følsomme de er, samt andre økonomiske, biologiske og økologiske faktorer af betydning. Hensynet til dataenes sammenlignelighed og den allerede gennemførte internationale harmonisering (henvisning (1)) bør ligeledes tages i betragtning ved valg af fiskearterne.

Tillæg 2 indeholder en liste over de fiskearter, der anbefales til gennemførelse af denne test; zebrafisk og regnbueørred foretrækkes.

1.6.3.1. *Opbevaring*

Testfisk skal fortrinsvis komme fra en enkelt bestand og være af samme længde og alder. Fiskene skal holdes i mindst 12 dage under følgende betingelser:

Belastning:

Passende for systemet (recirkulation eller gennemstrømning) og fiskearten.

Vand:

Se 1.6.1.2.

Lys:

12 til 16 timers lys dagligt.

Koncentration af opløst oxygen:

Mindst 80 % mætning.

Fodring:

Dagligt eller tre gange ugentligt, sidste gang 24 timer før testen påbegyndes.

1.6.3.2. *Dødelighed*

Efter en 48 timers tilpasningsperiode registreres dødeligheden, og følgende kriterier anvendes;

— større end 10 % af populationen på syv dage:

Hele partiet kasseres

— mellem 5 og 10 % af populationen:

Observationsperioden forlænges med yderligere syv dage.

Hvis der ikke sker flere dødsfald, accepteres partiet; i modsat fald må det kasseres

— mindre end 5 % af populationen:

Partiet accepteres.

1.6.4. **Tilvænning**

Alle fisk skal udsættes for vand af den kvalitet og med den temperatur, som vil blive anvendt i testen, i mindst syv dage, før de tages i anvendelse.

▼B

1.6.5. **Testens udførelse**

Forud for den endelige test kan der udføres en indledende test med det formål at skaffe oplysninger om, hvilke koncentrationer der skal anvendes i den endelige test.

Ud over testserien medtages en kontrolgruppe uden teststof og i givet fald en kontrolgruppe med hjælpestof.

Der vælges en statisk test, en semi-statisk test eller en gennemstrømningstest alt efter teststoffets fysiske og kemiske egenskaber, idet den bedst egnede til opfyldelse af kvalitetskriterierne vælges.

Fiskene udsættes for stoffet, som beskrevet nedenfor:

— varighed: 96 timer

— antal dyr: mindst 7 pr, koncentration

— kar: af passende størrelse i forhold til den anbefalede belastning

— belastning: For statiske og semi-statiske test anbefales 1 g/l som den maksimale belastning; for gennemstrømningstest kan større belastning accepteres

— testkoncentration: mindst fem koncentrationer med et konstant indbyrdes forhold på ikke over 2,2, som så vidt muligt dækker hele dødelighedsintervallet fra 0 til 100 %

— vand: se 1.6.1.2

— lys: 12 til 16 timers lys dagligt

— temperatur: passende for arten (tillæg 2) men inden for ± 1 ^{o}C i den enkelte test

— koncentration af opløst oxygen: ikke mindre end 60 % af mætning ved den valgte temperatur

— fodring: ingen.

Fiskene inspiceres efter de første 2 til 4 timer og derefter med højst 24 timers mellemrum. Fisk betragtes som døde, hvis berøring af haleroden ikke giver nogen reaktion og der ikke er synlige respirationsbevægelser. Døde fisk fjernes, når de observeres, og dødeligheden registreres. Synlige abnormaliteter (f.eks. tab af ligevægt, ændringer i svømmeadfærd, respirationsbevægelser og pigmentering) registreres.

pH, opløst oxygen og temperatur måles dagligt.

Grænsetest

En grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om LC_{50} er større end denne koncentration kan anvendes, hvis den fremgangsmåde, som er anført i denne testmetode, benyttes,

Hvis stoffet er af en sådan art, at der ikke kan opnås en koncentration på 100 mg/l i testvandet, udføres grænsetesten ved stoffets mætningskoncentration (eller den højeste koncentration, ved hvilken der dannes en stabil dispersion) i det anvendte medium (se også 1.6.1.1).

▼B

Grænsetesten udføres med 7-10 fisk og en eller to kontrolgrupper af samme størrelse. (Ifølge binomialteorien er der ved anvendelse af 10 fisk 99,9 % sikkerhed for, at LC_{50} er større end den anvendte koncentration, hvis dødeligheden er nul. Med 7, 8 eller 9 fisk giver en dødelighed på nul 99 % sikkerhed for, at LC_{50} er større end den anvendte koncentration).

Hvis der sker dødsfald, må der gennemføres en komplet undersøgelse. Eventuelle subletale virkninger registreres.

2. **DATA OG EVALUERING**

For hvert af de tidspunkter, hvor der er foretaget observationer (efter 24, 48, 72 og 96 timer), afsættes den procentvise dødelighed mod koncentrationen på logaritmisk sandsynlighedspapir.

For hvert observartionstidspunkt skønnes om muligt LC_{50} og konfidensgrænserne (p = 0,05) ved hjælp af standardprocedurer; disse værdier afrundes til ét, eller højst to betydende cifre (eksempler på afrunding til to cifre: 173,5 til 170; 0,127 til 0,13; 1,21 til 1,2).

I de tilfælde, hvor hældningen af koncentration/responsprocentkurven er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er et skøn ud fra kurven tilstrækkeligt.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et indbyrdes forhold på 2,2 giver en dødelighed på 0 og 100 %, er disse to værdier tilstrækkelige til angivelse af, i hvilket interval LC_{50} ligger.

Hvis det bemærkes, at teststoffet ikke kan holdes stabilt eller homogent, skal dette anføres, og resultaterne må fortolkes med forsigtighed.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— oplysninger om testfisk (videnskabeligt navn, stamme, leverandør, eventuel forbehandling, størrelse samt hvor mange der er anvendt ved hver restkoncentration)

— hvor det vand, der er anvendt til fortynding, kommer fra og dets vigtigste kemiske egenskaber (pH, hårdhed og temperatur)

— for stoffer, der er tungtopløselige i vand, hvilken metode der er anvendt til fremstilling af stam- og testopløsning

— koncentrationen af eventuelle hjælpestoffer

— en liste over de anvendte koncentrationer og alle foreliggende oplysninger om testkemikaliets stabilitet i testopløsningen ved disse koncentrationer

— metoder og resultater, hvis der er udført kemiske analyser

— resultaterne af en eventuel grænsetest

— begrundelse for og detaljer vedrørende den valgte testprocedure (f.eks. statisk, semi-statisk, doseringshastighed, gennemstrømningshastighed, beluftning, antal fisk, osv.)

▼B

— beskrivelse af testudstyret

— lysforhold

— koncentrationen af opløst oxygen, pH og temperatur i testopløsningerne hver 24. time

— godtgørelse af, at kvalitetskriterierne er opfyldt

— en tabel med den kumulative dødelighed for hver koncentration og for kontrolgruppen (samt i givet fald for kontrolgruppen med hjælpestof) på alle de anbefalede observationstidspunkter

— afbildning af koncentration/responsprocentkurve ved testens afslutning

— om muligt LC_{50}-værdier på alle de anbefalede observationstidspunkter (med 95 % konfidensgrænser)

— hvilke statistiske metoder der er anvendt til bestemmelse af LC_{50}

— hvis der er benyttet et referencestof, de fundne resultater

— højeste testkoncentration, der ikke forårsager nogen dødsfald inden for testperioden

— laveste testkoncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxidty of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Harailton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia recticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency. Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians, The Committee on Methods for Toxidty Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrenvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P, und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die ökotoxikologische Bewertung von Umwekchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J., Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelinck). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Tillæg 1

Kunstigt fremstillet ferskvand

Eksempel på vand egnet til fortynding

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller deioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 μScm^{-1}.

Vanddestillationsapparatet må ikke indeholde dele af kobber.

Stamopløsninger

$CaCl_2$ — $2H_2O$ (calciumchlorid dihydrat): 11,76 g
opløses i vand og fortyndes til 1 liter

$MgSO_4$ — $7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): 4,93 g
opløses i vand og fortyndes til 1 liter

$NaHCO_3$ (natriumhydrogencarbonat): 2,59 g
opløses i vand og fortyndes til 1 liter

KC1 (kaliumchlorid): 0,23 g
opløses i vand og fortyndes til 1 liter

Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding

25 ml af hver af de fire stamopløsninger blandes, og der fortyndes til 1 liter med vand.

Opløsningen beluftes, indtil koncentrationen af opløst oxygen svarer til værdien ved mætning.

pH skal være 7,8 ± 0,2.

Om nødvendigt justeres pH med NaOH (natriumhydroxid) eller HC1 (saltsyre).

Det således fremstillede vand til fortynding henstår i ca. 12 timer og beluftes ikke yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1 og mellem Na- og K-ioner 10:1. Opløsningens totale alkalinitet er 0,8 mmol/l.

Afvigelser ved fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke medføre ændringer i vandets sammensætning og egenskaber.

▼B

Tillæg 2

Fiskearter, der anbefales til testning

Anbefalede aner	Anbefalet temperaturinterval (°C)	Anbefalet længde af testdyr (cm)
Bracbydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20 til 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 til 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Karpe	20 til 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae(Tomminck og Schlegel 1850) japansk risfisk	20 til 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 til 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758)	20 til 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regenbueørred	12 til 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Guldfisk	20 til 24	6,0 ± 2,0

Opdrætsbetingelser

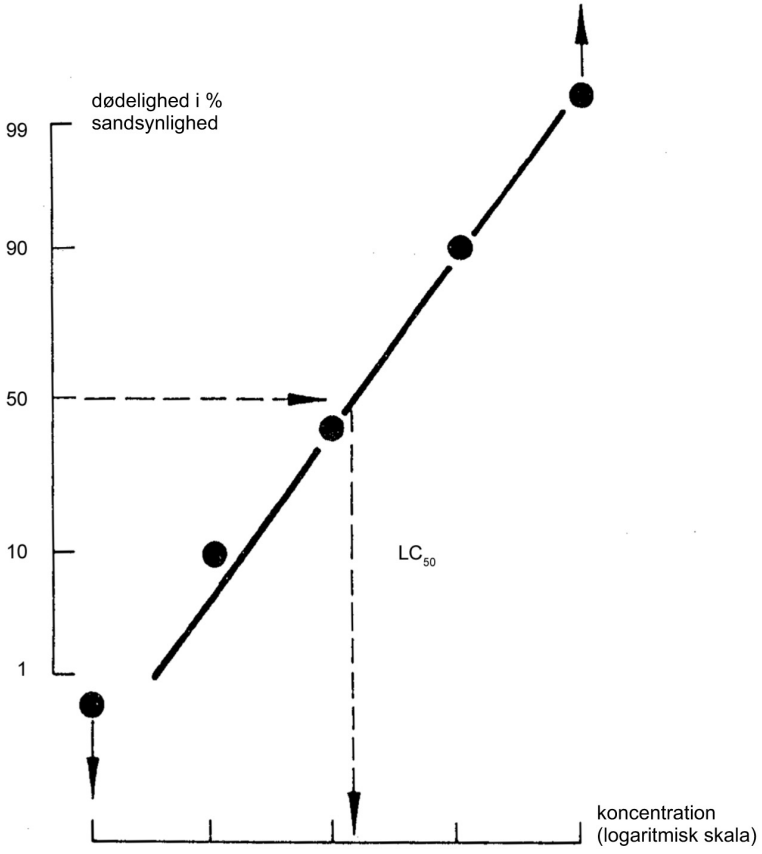
De ovenfor nævnte fisk er lette at opdrætte og/eller let tilgængelige hele året rundt. De kan opdrættes enten i dambrug eller i laboratoriet under sygdoms- og parasitfrie forhold, sådan at forsøgsdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk er tilgængelige i store dele af verden.

▼B

Tillæg 3

Eksempel på kurve over koncentration mod dødelighed

Eksempel på bestemmelse af LC_{50} på log/sandsynlighedspapir



▼B

C.2. DAPHNIA SP. AKUT IMMOBILISATIONSTEST

1. METODE

Den her beskrevne akutte immobilisationstest er ækvivalent med OECD TG 202 (2004).

1.1. INDLEDNING

Metoden beskriver en akut toksicitetstest til vurdering af kemiske stoffers virkning på dafnier. Så vidt muligt er anvendt eksisterende testmetoder (1)(2)(3).

1.2. DEFINITIONER

I forbindelse med denne metode anvendes følgende definitioner:

EC_{50}: er den koncentration, der er fundet at immobilisere 50 % af dafnierne i løbet af en nærmere angivet eksponeringsperiode. Benyttes en anden definition, skal dette angives tillige med den tilhørende henvisning.

Immobilisering: Dyr, der ikke er i stand til at svømme inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af testkarret, anses for at være immobiliseret (uanset om de stadig kan bevæge antennerne).

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Unge dafnier, som ved testens begyndelse er mindre end 24 timer gamle, eksponeres for forskellige koncentrationer af prøvestoffet i et tidsrum af 48 timer. Ved 24 og 48 timer registreres immobiliseringen, og der sammenholdes med kontrolværdier. Resultaterne analyseres med henblik på beregning af EC_{50} ved 48h (se definitioner i punkt 1.2). Bestemmelse af EC_{50} ved 24h er ikke obligatorisk.

1.4. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Prøvestoffets vandopløselighed og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af stoffet i prøveopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode med dokumenteret genfindingsgrad og bestemmelsesgrænse. Nyttige oplysninger om stoffet er dets strukturformel, renhed, stabilitet i vand og over for lys, P_{ow} samt resultater af en nedbrydelighedstest (se metode C.4).

Anm.: For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysiske-kemiske egenskaber, er der vejledning i (4).

1.5. REFERENCESTOFFER

Der kan testes et referencestof for EC_{50} for at sikre, at forsøgsbetingelserne er pålidelige. Hertil anbefales det at benytte de giftstoffer, der anvendes i internationale ringtest [1] (1)(5). Test med referencestof bør helst finde sted hver måned og mindst to gange årligt.

[1] Ifølge resultaterne af sådanne ringtest og en teknisk berigtigelse af ISO 6341 ligger EC_{50} — 24 h for kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) mellem 0,6 mg/l og 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITETSKRITERIER

Følgende præstationskriterier tjener til at afgøre om en test er gyldig:

— i kontrolprøverne, herunder kontrollen indeholdende opløsningsmidlet, må højst 10 % af dafnierne blive immobiliseret

— koncentrationen af opløst oxygen skal ved testens afslutning være ≥ 3 mg/l i kontrol- og testkar.

Anm.: Med henblik på det første kriterium må højst 10 % af kontroldafnierne udvise immobilisering eller andre tegn på sygdom eller stress såsom affarvning eller usædvanlig adfærd som f.eks. fastsidden i vandoverfladen.

1.7. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.7.1. **Apparatur**

Testkar og andet apparatur, der kommer i berøring med prøveopløsningerne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Som testkar anvendes normalt reagensglas eller bægerglas; hver gang disse anvendes, skal de forinden være rengjort med sædvanlige laboratoriemetoder. Testkarrene skal være løst tildækket for at mindske vandtab ved fordampning og for at undgå, at der kommer støv i opløsningerne. Flygtige stoffer testes i helt fyldte lukkede kar, der er store nok til at forhindre at oxygenkoncentrationen bliver en begrænsende faktor eller for lav (se punkt 1.6 og punkt 1.8.3, første afsnit).

Derudover anvendes der et eller flere af følgende udstyr: oxygenmeter (med mikroelektrode eller andet egnet udstyr til måling af opløst oxygen i prøver med lille volumen); pH-meter; egnet apparatur til temperaturregulering; udstyr til bestemmelse af total mængde organisk kulstof (TOC); udstyr til bestemmelse af kemisk iltforbrug (COD); udstyr til bestemmelse af hårdhed osv.

1.7.2. **Testorganisme**

Daphnia magna Straus er den foretrukne art, men andre egnede *Daphnia*-arter kan anvendes (f.eks. Daphnia pulex). Ved testens begyndelse skal dyrene være under 24 timer gamle, og for at mindske variabiliteten anbefales det stærkt, at man ikke anvender første kuld afkom. Dyrene skal hidrøre fra en sund bestand (dvs. fri for tegn på stress som høj dødelighed, tilstedeværelse af hanner og ephippia, forsinket frembringelse af første kuld, affarvede dyr osv.). Alle organismer, der anvendes i en given test, skal udgå fra kulturer etableret fra samme bestand af dafnier. Dyrene i bestanden skal holdes under vækstbetingelser (lys, temperatur, medium) svarende til de i testen anvendte. Skal der til testen benyttes et andet vækstmedium end de sædvanligvis anvendte vækstmedier til dafnier, er det god praksis at anvende en akklimatiseringsperiode inden testen. Denne består i, at dafnier fra kuldet opholder sig i fortyndingsvand ved testtemperaturen i mindst 48 timer, inden testen begynder.

▼B

1.7.3. **Opbevarings- og fortyndingsvand**

Som opbevarings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand, såfremt dafnier kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings-, akklimatiserings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Vand er egnet som testvand, når det er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for fortyndingsvand i bilag 1. Vandets kvalitet skal være konstant under hele testen. Rekonstitueret vand kan fremstilles ved, at deioniseret eller destilleret vand tilsættes nærmere bestemte mængder reagenser af anerkendt analysekvalitet. Eksempler på rekonstitueret vand er givet i (1) og (6) og i bilag 2. Det skal bemærkes, at metalholdige stoffer ikke bør testes med medier indeholdende kendte chelaterende stoffer som M4- og M7-medierne i bilag 2. pH skal være mellem 6 og 9. Til *Daphnia magna* anbefales en hårdhed på mellem 140 og 250 mg/l (som $CaCO_3$), men mindre hårdhed kan også være hensigtsmæssig til andre arter af Daphnia. Fortyndingsvandet kan luftes inden dets anvendelse i testen, så det er mættet med opløst oxygen.

Anvendes råvand, skal kvalitetsparametrene måles mindst to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt (se foregående afsnit og bilag 1). Måling af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) skal ligeledes foretages. Anvendes afkloret ledningsvand, er daglig chlorbestemmelse ønskelig. Hidrører fortyndingsvandet fra overflade- eller grundvand, skal dets ledningsevne og totale organiske kulstofindhold (TOC) eller kemiske iltforbrug (COD) bestemmes.

1.7.4. **Testopløsninger**

Sædvanligvis fremstilles testopløsningerne i de valgte koncentrationer ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger skal fortrinsvis fremstilles ved opløsning af prøvestoffet i fortyndingsvandet. Brug af opløsningsmidler, emulgatorer og dispergeringsmidler skal så vidt muligt undgås. I visse tilfælde kan sådanne forbindelser dog være nødvendige for at få en tilpas koncentreret stamopløsning. Vejledning om egnede opløsningsmidler, emulgatorer og dispergeringsmidler er givet i (4). I alle tilfælde må indholdet af prøvestof i testopløsningerne ikke overstige stoffets opløselighed i fortyndingsvandet.

Testen skal udføres uden justering af pH. Hvis pH ikke holder sig i området 6-9, kan der efterfølgende foretages endnu en test, hvor stamopløsningens pH er justeret til pH af fortyndingsvandet, før prøvestof tilsættes. pH-justeringen skal ske således, at stamopløsningens koncentration ikke ændres nævneværdigt, og så det ikke forårsager en kemisk reaktion eller udfældning af prøvestoffet. HCl og NaOH må foretrækkes.

▼B

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.8.1.1. *Testgrupper og kontrolgrupper*

Testkarrene påfyldes det korrekte rumfang fortyndingsvand og prøvestofopløsning. Luft/vand-volumenforholdet i karret skal være ens i test- og kontrolgruppen. Dafnierne overføres derefter til testkarrene. For hver testkoncentration og til kontrol skal anvendes mindst 20 dyr, helst opdelt i fire grupper på hver fem dyr. Der skal være mindst 2 ml testopløsning for hvert dyr (altså 10 ml til fem dafnier pr. testkar). Er prøvestofkoncentrationen ikke stabil, kan testen udføres i et system med halvstatisk udskiftning eller et gennemstrømningssystem.

Foruden behandlingsserien testes én kontrolserie med fortyndingsvand og én kontrolserie indeholdende et eventuelt opløsningsmiddel.

1.8.1.2. *Testkoncentrationer*

Der kan udføres et forberedende forsøg til fastlæggelse af koncentrationsområdet for den endelige test, medmindre oplysninger om prøvestoffets toksicitet allerede foreligger. Herunder eksponeres dafnierne for en række vidt forskellige koncentrationer af prøvestoffet. Fem dafnier eksponeres for hver testkoncentration i op til 48 timer, og flerdobbeltbestemmelse er ikke nødvendigt. Eksponeringsperioden kan afkortes (f.eks. til 24 timer eller derunder), hvis egnede data i det forberedende forsøg kan opnås på kortere tid.

Der skal anvendes mindst fem testkoncentrationer. Disse vælges som en kvotientrække med en kvotient på helst ikke over 2,2. Anvendes færre end fem koncentrationer, skal dette begrundes. Den højeste testede koncentration skal helst medføre 100 % immobilisering, mens den laveste helst ikke må medføre nogen observerbar effekt.

1.8.1.3. *Inkuberingsbetingelser*

Temperaturen skal være mellem 18 °C og 22 °C og skal i den enkelte test være konstant inden for ± 1 °C. En cyklus bestående af 16 timers lys og 8 timers mørke anbefales. Fuldstændigt mørke er også acceptabelt, specielt for prøvestoffer, der er ustabile i lys.

Testkarrene må ikke beluftes under testen. Testen udføres uden justering af pH. Dafnierne må ikke fodres under testen.

1.8.1.4. *Varighed*

Testens varighed er 48 timer.

1.8.2. **Bemærkninger**

Hvert testkar kontrolleres for immobiliserede dafnier 24 og 48 timer efter testens begyndelse. (se definitionerne i punkt 1.2). Ud over immobilitet rapporteres om al unormal adfærd eller fremtræden.

▼B

1.8.3. **Analytiske målinger**

Ved testens begyndelse og slutning måles opløst oxygen og pH i kontrolprøve(r) og i den højeste prøvestofkoncentration. Koncentrationen af opløst oxygen i kontrollerne skal være i overensstemmelse med validitetskriteriet (se punkt 1.6). pH må normalt ikke variere mere end 1,5 enhed i nogen enkelt test. Temperaturen måles sædvanligvis i kontrolkarrene eller i den omgivende luft og skal helst registreres kontinuerligt under testen eller i det mindste ved testens begyndelse og slutning.

Prøvestofkoncentrationen måles i det mindste ved den højeste og laveste prøvestofkoncentration ved testens begyndelse og slutning (4). Det anbefales at resultaterne baseres på de målte koncentrationer. Hvis prøvestofkoncentrationen kan dokumenteres at have været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration under hele testen, kan resultaterne dog baseres på de nominelle eller målte begyndelsesværdier.

1.9. GRÆNSETEST

Med den i denne metode beskrevne fremgangsmåde kan udføres en grænsetest ved en prøvestofkoncentration på 100 mg/l, dog ikke højere end stoffets opløselighed i testmediet, med henblik på at godtgøre at EC_{50} er større end denne koncentration. Til grænsetesten anvendes 20 dafnier (helst opdelt i fire grupper på hver fem dyr), og samme antal kontroldyr. Hvis der forekommer immobilisering, udføres en fuld undersøgelse. Al observeret unormal adfærd registreres.

2. **DATA**

Data sammenfattes i tabeller, der for hver behandlings- og kontrolgruppe viser det anvendte antal dafnier og immobiliserede dyr ved hver observation. Der optegnes en kurve over procentdel immobiliserede dyr ved 24 timer og 48 timer som funktion af prøvestofkoncentrationen. Der anvendes passende statistiske metoder (f.eks. probabalistisk analyse osv.) til beregning af kurvehældninger og EC_{50} med 95 % konfidensintervaller (p = 0,05) (7) (8).

Når standardmetoder til beregning af EC_{50} ikke kan anvendes på de målte data, benyttes den højeste koncentration, der ikke medfører immobilitet, og den laveste koncentration, der medfører 100 % immobilitet, til tilnærmet beregning af EC_{50} (idet denne sættes til det geometriske gennemsnit af de to koncentrationer).

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende:

Teststof:

— fysisk form og, når det er relevant, fysiske-kemiske egenskaber

▼B

— kemiske identifikationsdata, herunder renhed.

Den testede dyreart:

— kilde til og art af Daphnia, leverandør af kilden (hvis den kendes) og anvendte vækstbetingelser (herunder foderets oprindelse, art og mængde samt fodringshyppighed).

Testbetingelser:

— beskrivelse af testkarrene: karrenes art, opløsningens volumen, antal dafnier pr. testkar, antal testkar (gentagelser) pr. koncentration

— metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler, samt anvendte koncentrationer

— oplysninger om fortyndingsvandet: oprindelse og kvalitetskarakteristika (pH, hårdhed, Ca/Mg-forhold, Na/K-forhold, alkalinitet, ledningsevne osv.); hvis rekonstitueret vand anvendes, dettes sammensætning

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, opløst oxygen, pH osv.

Resultater:

— antal og procentdel dafnier, der er blevet immobiliseret eller udviser negativ påvirkning (herunder unormal opførsel) i kontroldyrene og i hver behandlingsgruppe, på hvert observationstidspunkt, samt beskrivelse af arten af de iagttagne virkninger

— resultater og dato for test udført med referencestof, hvis de foreligger

— nominelle prøvekoncentrationer og resultat af alle analyser til bestemmelse af prøvestofkoncentrationen i testkarrene; metodens genfindingsgrad og bestemmelsesgrænse skal ligeledes rapporteres

— alle fysiske-kemiske målinger af temperatur, pH og opløst oxygen, som er foretaget under testen

— EC_{50} ved 48 h for immobilisering, med konfidensintervaller og kurver over den tilpassede model, der anvendt til beregning heraf, dosis-responskurvers hældning og middelfejlen herpå; statistiske metoder, der er anvendt til bestemmelse af EC_{50}; (tilsvarende data vedrørende immobilisering ved 24 h skal ligeledes rapporteres, når de er målt)

— forklaring vedrørende eventuel afvigelse fra testmetoden, og hvorvidt afvigelsen påvirkede testresultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/1 1. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp. 65-84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Bilag 1

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA AF ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Stof	Koncentration
Partikler	< 20 mg/l
Total mængde organisk kulstof (TOC)	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Chloroverskud	< 10 µg/l
Total mængde organiske fosforpesticider	< 50 ng/l
Total mængde organiske chlorpesticider plus polychlorerede biphenyler	< 50 ng/l
Total mængde organisk chlor	< 25 ng/l

▼B

Bilag 2

EKSEMPLER PÅ VELEGNET REKONSTITUERET TESTVAND

ISO-testvand (1)

Stamopløsninger (enkeltstof)		Rekonstitueret vand fremstilles ved tilsætning af følgende rumfang stamopløsninger til 1 liter vand (*)
Stof	Mængde tilsat til 1 liter vand (*)	
Calciumchlorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbicarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumchlorid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Vand af passende renhed, f.eks. deioniseret, destilleret eller behandlet ved omvendt osmose, fortrinsvis med ledningsevne ikke over 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt medium M7 og M4

Akklimatisering til Elendt medium M4 og M7

I nogle laboratorier har det medført problemer at overføre dafnier direkte til M4- og M7-medium. Dog er med noget held anvendt gradvis akklimatisering, dvs. flytning fra eget medium til 30 % Elendt efterfulgt af 60 % Elendt og derefter 100 % Elendt. En akklimatiseringsperiode på helt op til en måned kan være nødvendig.

Fremstilling

Mikronæringsstoffer

Først fremstilles der separate stamopløsninger (I) af hvert mikronæringsstof i vand af passende renhed, f.eks. deioniseret, destilleret eller behandlet ved omvendt osmose. Af disse forskellige stamopløsninger (I) fremstilles én enkelt stamopløsning (II) indeholdende alle mikronæringsstoffer (kombineret opløsning), dvs.:

Stamopløsning(er) I (enkeltstof)	Mængde tilsat til vand (mg/l)	Koncentration (i forhold til medium M4)	Til fremstilling af den kombinerede stamopløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 gange	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 gange	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 gange	1,0	0,25

▼B

Stamopløsning(er) I (enkeltstof)	Mængde tilsat til vand (mg/l)	Koncentration (i forhold til medium M4)	Til fremstilling af den kombinerede stamopløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 gange	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 gange	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 gange	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 gange	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 gange	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 gange	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 gange	1,0	1,0
Kl	65	20 000 gange	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000 gange	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 gange	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 gange	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 gange	—	—

De to opløsninger af Na_2 EDTA og $FeSO_4$ fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Derved fås:

2 l Fe-EDTA opløsning		1 000 gange	20,0	5,0

M 4 - o g M 7 - m e d i u m

M4- og M7-medierne fremstilles af stamopløsning II, makronæringsstoffer og vitaminer på følgende måde:

	Mængde tilsat til vand (mg/l)	Koncentration (i forhold til medium M4)	Mængde stamopløsning II tilsat til fremstilling afmediet (ml/l)	
			M4	M7
Stamopløsning II (kombinerede sporstoffer)		20 gange	50	50
Stamopløsninger af makronæringsstoffer (enkeltstof)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000 gange	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 gange	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 gange	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 gange	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 gange	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 gange	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 gange	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 gange	0,1	0,1

▼B

	Mængde tilsat til vand (mg/l)	Koncentration (i forhold til medium M4)	Mængde stamopløsning II tilsat til fremstilling afmediet (ml/l)	
			M4	M7
Kombineret vitamin-stamopløsning	—	10 000 gange	0,1	0,1
Den kombinerede vitamin-stamopløsning fremstilles ved tilsætning af de tre vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:				
Thiaminhydrochlorid	750	10 000 gange		
Cyanocobalamin (B_{12})	10	10 000 gange		
Biotin	7,5	10 000 gange		

Den kombinerede vitamin-stamopløsning opbevares nedfrosset i små aliquoter. Vitaminer tilsættes til medierne kort inden disse anvendes.

NB: For at undgå saltudfældning ved fremstilling af de komplette medier tilsætter man først aliquoterne af stamopløsningerne til 500-800 ml deioniseret vand, hvorefter der fyldes op til 1 liter.

NB: M4-mediet blev første gang beskrevet i Elendt, B. P. (1990): Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3. FERSKVANDSALGER OG CYANOBAKTERIER, VÆKSTHÆMNINGSTEST

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 201 (2006, bilag berigtiget i 2011). Testmetoden bør revideres, idet der indsættes yderligere arter, og opdateres, således at den opfylder behovene for vurdering af kemikaliers farlighed og klassificering. Revisionen er foretaget på grundlag af de omfattende praktiske erfaringer med testen, den videnskabelige udvikling inden for algetoksicitetsundersøgelser samt de kontrollerende myndigheders udstrakte anvendelse af testen, siden denne oprindeligt blev indført.

2. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Testens formål er at bestemme kemikaliets påvirkning af væksten af ferskvandsmikroalger og/eller cyanobakterier. Testorganismer i eksponentiel vækst eksponeres for kemikaliet i batchkulturer i et tidsrum på normalt 72 timer. Til trods for testens forholdsvis korte varighed giver den mulighed for at vurdere virkningerne på flere generationer.

4. Systemets respons er væksthæmningen i en række algekulturer (testenheder), der eksponeres for forskellige koncentrationer af et testkemikalie. Responsen udtrykkes som funktion af eksponeringskoncentrationen og sammenholdes med gennemsnitsvæksten i ikke-eksponerede replikatkontrolkulturer. For at systemets respons på toksiske virkninger kan komme fuldt til udtryk (optimal følsomhed), lader man kulturerne vokse uhæmmet eksponentielt med tilstrækkelige næringsstoffer og kontinuerlig belysning, tilstrækkelig længe til at hæmningen af den specifikke vækshastighed kan måles.

5. Vækst og væksthæmning bestemmes kvantitativt ved måling af algebiomassen som funktion af tiden. Algebiomasse defineres som tørvægt pr. volumenenhed, f.eks. mg alger/liter testopløsning. Tørvægt er imidlertid vanskelig at måle, hvorfor der anvendes surrogatparametre. Af sådanne surrogater er celletal det mest anvendte. Andre surrogatparametre er cellevolumen, fluorescens, optisk tæthed mv. Omregningsfaktoren mellem den målte surrogatparameter og biomassen skal være kendt.

6. Endepunktet for testen er væksthæmning, udtrykt som den logaritmiske stigning i biomasse (gennemsnitlig specifik vækshastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke vækshastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og denne betegnes E_rC_x (f.eks. E_rC_{50}).

7. I denne metode anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelser i visse lande. Udbyttet defineres som biomassen ved eksponeringsperiodens slutning minus biomassen ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) i udbyttet, og denne betegnes E_yC_x (f.eks. E_yC_{50}).

8. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

▼M6

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Med henblik på fastsættelse af testbetingelser vil det være nyttigt at kende testkemikaliets strukturformel, renhed, lysstabilitet, stabilitet under testbetingelserne, lysabsorptionsegenskaber, pKa og resultaterne af omdannelsesundersøgelser, herunder bionedbrydeligheden i vand.

10. Kemikaliets vandopløselighed, octanol/vand-fordelingskoefficient (P_{ow}) og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode, hvis restitutionsevne og detektionsgrænse rapporteres.

TESTENS VALIDITET

11. Til afgørelse af, om en test er valid, anvendes følgende præstationskriterier:

— Biomassen i kontrolkulturerne skal være steget eksponentielt med mindst en faktor 16 i løbet af testperioden på 72 timer. Dette svarer til en specifik væksthastighed på 0,92 dag^{-1}. For de oftest anvendte arter er væksthastigheden sædvanligvis betydeligt højere (se tillæg 2). Dette kriterium er ikke nødvendigvis opfyldt for arter, der er mere langsomtvoksende end de i tillæg 2 anførte. I så fald må testperioden forlænges, så der opnås en vækst til mindst det 16-dobbelte i kontrolkulturerne, og så væksten er eksponentiel i hele testperioden. For at opretholde uhæmmet eksponentiel vækst under testen kan testperioden afkortes til ikke under 48 timer, når blot minimumsmultiplikationsfaktoren på 16 nås.

— Den gennemsnitlige variationskoefficient af den trinvise specifikke væksthastighed (ved 72-timers test, dag 0-1, 1-2 og 2-3) i kontrolkulturerne (se tillæg 1 under »variationskoefficient«) må ikke være over 35 %. Vedrørende beregning af trinvis specifik væksthastighed: se punkt 49. Kriteriet gælder for gennemsnitsværdien af variationskoefficienterne for kontrolkulturreplikater.

— Variationskoefficienten for de gennemsnitlige specifikke væksthastigheder i hele testperioden i kontrolkulturreplikater må ikke være over 7 % i test med Pseudokirchneriella subcapitata og Desmodesmus subspicatus. For andre, mindre hyppigt benyttede testarter må værdien ikke være over 10 %.

REFERENCEKEMIKALIE

12. Til kontrol af testmetoden kan der testes et eller flere referencekemikalier, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (1). Kaliumdichromat kan ligeledes anvendes som referencekemikalie for grønalger. Det er ønskeligt, at der et referencekemikalie testes mindst to gange årligt.

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

13. Metoden er bedst anvendelig på vandopløselige kemikalier, som under testbetingelserne forventes at forblive i vandet. Til testning af kemikalier, der er flygtige, stærkt adsorberende, farvede eller tungtopløselige i vand, eller som kan ændre tilgængeligheden af næringsstoffer eller mineraler i testsubstratet,

▼M6

kan visse ændringer af den beskrevne fremgangsmåde være nødvendige (f.eks. lukket system eller konditionering af testbeholderne). Anvisninger for sådanne ændringer er givet i (2), (3) og (4).

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparatur

14. Bægerglas og andet apparatur, der kommer i kontakt med testopløsningerne, skal være fremstillet af rent glas eller andet kemisk inert materiale. Det pågældende udstyr skal være omhyggeligt vasket, for at sikre at ingen organiske eller uorganiske kontaminanter kan forstyrre algevæksten eller testopløsningernes sammensætning.

15. Som testbeholdere anvendes sædvanligvis glaskolber af en størrelse, der giver tilstrækkeligt kulturvolumen til målingerne under testen og tilstrækkelig masseoverførsel af CO_2 fra atmosfæren (se punkt 30). Bemærk, at der skal være tilstrækkeligt væskevolumen til de analytiske bestemmelser (se punkt 37).

16. Derudover kan der være brug for følgende udstyr eller en del deraf:

— dyrkningsapparatur: Det anbefales at benytte et kabinet eller kammer med mulighed for fastholdelse af den valgte inkubationstemperatur inden for ± 2 °C.

— instrumenter til lysmåling: Man må være opmærksom på, at den anvendte metode til lysintensitetsmåling, specielt den anvendte type detektor (kollektor), kan påvirke måleværdien. Til målingerne skal fortrinsvis benyttes en sfærisk detektor (4 π-detektor) (som reagerer på direkte og reflekteret lys fra alle vinkler over og under måleplanet) eller en 2 π-detektor (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet).

— apparatur til bestemmelse af algebiomasse: Celletal, der er den oftest anvendte surrogatparameter for algebiomasse, kan bestemmes med en elektronisk partikeltæller, et mikroskop med tællekammer eller et flowcytometer. Andre biomassesurrogater kan måles med flowcytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Det er hensigtsmæssigt at beregne en omregningsfaktor fra celletal til tørvægt. Ved spektrofotometrisk bestemmelse af lave biomassekoncentrationer kan det være nødvendigt at bruge kuvetter med en lysvej på mindst 4 cm for at få brugbare målinger.

Testorganismer

17. Der kan anvendes forskellige arter af ikke-fastsiddende mikroalger og cyanobakterier. De i tillæg 2 opførte stammer har vist sig velegnede ved brug af fremgangsmåden i denne testmetode.

18. Benyttes andre arter, skal stamme og/eller oprindelse angives. Det kontrolleres, at der kan opretholdes eksponentiel vækst af de valgte testalger i hele testperioden under de givne betingelser.

Næringssubstrat

19. To alternative næringssubstrater, OECD-substratet og AAP-substratet, anbefales. Substraternes sammensætning er angivet i tillæg 3. Bemærk, at de to substraters initiale pH-værdi og bufferkapacitet (som regulerer pH-stigningen) er forskellige. Testen kan derfor give forskelligt resultat afhængigt af substratet, specielt ved testning af ioniserende kemikalier.

▼M6

20. Til visse formål kan det være nødvendigt at modificere substratet, f.eks. ved testning af metaller og chelaterende midler, eller når testning finder sted ved afvigende pH-værdier. Modificerede substrater skal beskrives i detaljer og deres anvendelse begrundes (3)(4).

Initial biomassekoncentration

21. Den initiale biomasse i testkulturerne skal være ens i alle testkulturer og tilstrækkelig lav til at muliggøre eksponentiel vækst i hele inkubationsperioden, uden risiko for at næringsstofferne opbruges. Den initiale biomasse må ikke udgøre mere end 0,5 mg/l som tørvægt. Følgende initiale cellekoncentrationer anbefales:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ celler/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ celler/ml
Navicula pelliculosa	10^4 celler/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 celler/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ celler/ml

Testkemikaliekoncentrationer

22. Der kan udføres indledende test til at fastlægge det koncentrationsområde, hvor der kan forventes en effekt. Til den endelige test skal der vælges mindst fem koncentrationer, der er ordnet i en geometrisk serie med en faktor på højst 3,2. For testkemikalier med flad koncentrationsresponskurve kan en højere faktor være berettiget. Koncentrationsserien skal fortrinsvis dække det område, der medfører 5-75 % hæmning af algevæksthastigheden.

Replikater og kontroller

23. Testens design skal indeholde tre replikater ved hver testkoncentration. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der anvendes flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal være mindst tre replikater af kontrollerne, og ideelt dobbelt så mange som antallet af replikater for hver testkoncentration.

24. Der kan fremstilles et separat sæt testopløsninger til analytisk bestemmelse af testkemikaliekoncentrationerne (se punkt 36 og 38).

25. Anvendes der et opløsningsmiddel til at bringe testkemikaliet i opløsning, skal testen omfatte ekstra kontroller indeholdende opløsningsmidlet i samme koncentration som i testkulturerne.

Fremstilling af podekultur

26. For at lade de testede alger tilpasse sig til testbetingelserne og sikre, at algerne er i den eksponentielle vækstfase, når de benyttes til podning af testopløsningerne, fremstilles en podekultur i testsubstratet, 2-4 dage før testen begynder. Mængden af algebiomasse skal tilpasses, så der bliver eksponentiel vækst i podekulturen, indtil testen begynder. Podekulturen skal inkuberes under samme betingelser som testkulturerne. Stigningen i

▼M6

biomasse i podekulturen skal måles, for at sikre at væksten er inden for normalområdet for den pågældende teststamme under dyrkningsbetingelserne. Et eksempel på fremgangsmåden ved dyrkning af alger er beskrevet i tillæg 4. For at undgå synkrone celledelinger under testen kan et ekstra trin til formering af podekulturen være nødvendigt.

Fremstilling af testopløsninger

27. Alle testopløsninger skal indeholde samme koncentration af næringssubstrat og initial biomasse af testalger. Testopløsningerne af de valgte koncentrationer fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af testkemikaliet opblandes med næringssubstrat og podekultur. Stamopløsningerne fremstilles normalt ved opløsning af testkemikaliet i testsubstrat.

28. Opløsningsmidler, f.eks. acetone, t-butylalkohol og dimethylformamid, kan bruges som bæremedier, når kemikalier med ringe vandopløselighed skal tilsættes testsubstratet (2)(3). Koncentrationen af opløsningsmiddel må ikke være over 100 µl/l, og det skal tilsættes i samme koncentration til alle kulturer (også kontrollerne) i testserien.

Inkubation

29. Testbeholderne lukkes med luftgennemtrængelige propper. Testbeholderne omrystes og anbringes i dyrkningsapparatet. Under testen skal algerne holdes opslæmmet og CO_2-overførslen lettes. Kontinuerlig omrystning eller omrøring er derfor nødvendig. Kulturerne skal være reguleret til en temperatur i området 21 til 24 °C, og den fastsatte temperatur skal holdes inden for ± 2 °C. Til andre arter end de i tillæg 2 anførte, f.eks. tropiske arter, kan højere temperaturer være hensigtsmæssigt, forudsat at validitetskriterierne kan opfyldes. Det anbefales at placere kolberne i vilkårlig rækkefølge og dagligt bytte rundt på dem i inkubatoren.

30. Kontrolmediets pH må højst stige med 1,5 enheder under testen. For metaller og kemikalier, der kun er delvist ioniseret ved pH-værdier omkring testens pH, kan det være nødvendigt at begrænse pH-afvigelsen for at få reproducerbare og veldefinerede resultater. Begrænsning af afvigelsen til < 0,5 pH-enhed er teknisk mulig og kan opnås ved at sikre tilstrækkelig CO_2-masseoverførsel fra den omgivende luft til testopløsningen, f.eks. ved at øge omrystningshastigheden. En anden mulighed er at nedsætte CO_2-behovet ved enten at reducere den initiale biomasse eller testens varighed.

31. Den overflade, som kulturerne inkuberes på, skal have kontinuerlig, ensartet fluorescerende belysning, f.eks. af typen »cool-white« eller »daylight«. Forskellige stammer af alger og cyanobakterier har forskelligt lysbehov. Der skal vælges en passende lysintensitet i forhold til den anvendte organisme. Til de anbefalede arter af grønalger skal lysintensiteten i testopløsningernes niveau vælges i området 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, målt i det fotosyntetisk effektive bølgelængdeområde 400-700 nm med en egnet detektor. Visse arter, navnlig Anabaena flos-aquae, vokser godt ved lavere lysintensitet og kan tage skade af højere intensitet. Til sådanne arter bør vælges en gennemsnitlig lysintensitet i området 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (For lysmåleinstrumenter kalibreret i lux vil den anbefalede lysintensitet på 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ med cool-white-lys tilnærmelsesvis svare til området 4 440-8 800 lux). Lysintensiteten må ikke afvige mere end ± 15 % fra den gennemsnitlige lysintensitet i hele inkubationsområdet.

▼M6

Testens varighed

32. Testens varighed er normalt 72 timer. Kortere eller længere varighed kan dog anvendes, forudsat at alle validitetskriterierne i punkt 11 kan opfyldes.

Målinger og analytiske bestemmelser

33. Algebiomassen i hver kolbe bestemmes mindst en gang dagligt i hele testperioden. Hvis målingerne foretages på små volumener, der er udtaget af testopløsningen med pipette, bør disse ikke erstattes.

34. Måling af biomasse foretages enten ved manuel celletælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller (i celletal og/eller biovolumen). Andre teknikker kan anvendes, f.eks. flowcytometri, in vitro eller in vivo chlorophyl-fluorescens (5)(6) eller optisk densitet, hvis der kan påvises tilfredsstillende korrelation med biomasse i hele det biomasseområde, der forekommer under testen.

35. Opløsningernes pH skal måles ved testens start og slutning.

36. Hvis der foreligger en analysemetode til bestemmelse af testkemikaliet i det anvendte koncentrationsområde, skal testopløsningerne analyseres til efterprøvning af startkoncentrationerne og af, at eksponeringskoncentrationerne overholdes under testen.

37. Hvis eksponeringskoncentrationerne under testen forventes at afvige mindre end 50 % fra de nominelle værdier, kan det være tilstrækkeligt at bestemme en høj og en lav testkemikaliekoncentration og en koncentration omkring den forventede EC_{50} ved testens begyndelse og slutning. Når koncentrationen ikke kan forventes at holde sig inden for 80-120 % af den nominelle koncentration, anbefales analytisk bestemmelse af alle testkoncentrationer ved testens begyndelse og slutning. Til flygtige, ustabile eller stærkt adsorberende testkemikalier anbefales det at udtage supplerende prøver til analyse med 24 timers mellemrum i hele eksponeringsperioden for bedre at bestemme tabet af testkemikaliet. For disse kemikalier kan der være brug for supplerende replikater. I alle tilfælde behøver testkemikaliekoncentrationen kun bestemmes på en testbeholderreplikat ved hver testkoncentration (eller indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).

38. Testsubstrater, der er fremstillet specielt til analyse af eksponeringskoncentrationerne under testen, skal behandles på samme måde som dem, der anvendes til testning, dvs. podes med alger og inkuberes ved identiske betingelser. Hvis koncentrationen af opløst testkemikalie kræves analyseret, kan det være nødvendigt at separere algerne fra substratet. Separationen skal fortrinsvis ske ved centrifugering med lav g-kraft, som er tilstrækkelig til at få algerne til at bundfælde.

39. Hvis det kan konstateres, at testkemikaliekoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end ± 20 %, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (3)(7).

▼M6

40. Algevæksthæmning er et mere dynamisk testsystem end de fleste andre korttidstest for akvatisk toksicitet. De faktiske eksponeringskoncentrationer kan derfor være vanskelige at fastlægge, navnlig for adsorberende kemikalier, der testes ved lav koncentration. I sådanne tilfælde er testkemikaliets forsvinden fra opløsningen ved adsorption til den voksende algebiomasse ikke ensbetydende med, at det forsvinder fra testsystemet. Ved analyse af testresultatet skal det kontrolleres, om et fald i testkemikaliekoncentrationen under testen ledsages af et fald i væksthæmningen. Hvis det er tilfældet, kan det overvejes at benytte en egnet model, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (7). Hvis ikke, kan det være hensigtsmæssigt at basere analysen af resultaterne på de initiale (nominelle eller målte) koncentrationer.

Andre observationer

41. Der skal foretages mikroskopisk undersøgelse for at verificere, at podekulturen fremtræder normal og sund, og konstatere, om algernes udseende er unormalt ved testens slutning (som en mulig følge af eksponeringen for testkemikaliet).

Grænsetest

42. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikaliet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier gælder for grænsetesten, bortset fra at antallet af behandlingsreplikater skal være mindst seks. Responsvariablene i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test. Er variansen i de to grupper uens, skal der anvendes en t-test justeret for forskel i varians.

DATA OG RAPPORTERING

Optegning af vækstkurver

43. Biomassen i testbeholderne kan angives i enheder svarende til den til målingen anvendte surrogatparameter (f.eks. celletal eller fluorescens).

44. Der opstilles en tabel over den beregnede biomassekoncentration i testkulturer og kontroller sammen med teststofkoncentrationer og måletidspunkter, målt med en mindste opløsning på hele timer, og derudfra optegnes vækstkurverne. Både logaritmisk og lineær afbildning kan være nyttig på dette første trin, men logaritmisk afbildning er obligatorisk og giver sædvanligvis en bedre fremstilling af variationerne i vækstmønsteret i løbet af testperioden. Bemærk, at eksponentiel vækst frembringer en ret linje, når den afbildes på en logaritmisk skala, og at linjens hældning angiver den specifikke vækshastighed.

45. Ud fra kurverne undersøges det, om kontrolkulturerne vokser eksponentielt med den forventede hastighed igennem hele testen. Alle datapunkter og kurvernes udseende kontrolleres kritisk, og rådata og de anvendte metoder gås efter for eventuelle fejl. Navnlig kontrolleres alle datapunkter, der synes at afvige med en systematisk fejl. Det er indlysende, at hvis metodefejl kan konstateres og/eller må anses for stærkt sandsynlige, må det pågældende punkt markeres som afvigende og udelades af den efterfølgende statistiske analyse. (En algekoncentration på nul i den ene af tre testbeholderreplikater kan tyde på, at beholderen enten ikke er blevet podet korrekt eller ikke har

▼M6

været tilstrækkelig rengjort.) Begrundelsen for at afvise et datapunkt som afvigende skal klart angives i testrapporten. Som begrundelse godtages kun (sjældne) metodefejl, ikke blot ringe præcision. Til identifikation af afvigende værdier har statistiske metoder kun begrænset værdi ved problemer af denne art og kan ikke erstatte en faglig vurdering. Afvigende værdier (mærket som sådanne) skal helst bibeholdes blandt de datapunkter, der vises ved efterfølgende fremstilling af data i grafer eller tabeller.

Responsvariable

46. Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på væksten af alger. I nærværende testmetode beskrives to responsvariable, da præferencer og myndighedskrav er forskellige fra land til land. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle lande, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariable a) og b).

a) gennemsnitlig specifik vækshastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske stigning i biomasse i løbet af testperioden, angivet pr. døgn

b) udbytte: Denne responsvariabel er biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start.

47. Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og at forskellen mellem dem må haves for øje ved anvendelse af testens resultater. ECx-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (ErCx) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte (EyCx), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik væksthastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for alger i ikke-begrænsede kulturer, mens toksicitet vurderes på grundlag af virkningerne på væksthastigheden og ikke afhænger af kontrollens absolutte specifikke væksthastighed, koncentrationsresponskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariablen for udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variable. E_yC_x afhænger af den specifikke væksthastighed af de algearter, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke væksthastighed, som kan variere mellem forskellige arter og endda algestammer. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer hos forskellige algearter eller -stammer. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, indeholder nærværende testmetode toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse lande.

Gennemsnitlig væksthastighed

48. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i biomassen ved hjælp af ligningen for hver enkelt testbeholder med kontrol- og behandlingsprøver [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dag}^{-1}) \qquad [1]$$

hvor:

μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed fra tiden i til j

X_i er biomassen ved tiden i

X_j er biomassen ved tiden j.

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimater for variansen.

49. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i hele testperioden (sædvanligvis dag 0-3) beregnes ved at bruge den nominelt podede biomasse som startværdi i stedet for en målt startværdi, da der herved sædvanligvis opnås størst præcision. Hvis udstyret til biomassemåling tillader tilstrækkelig nøjagtig bestemmelse af den lille mængde podede biomasse (f.eks. med flowcytometer), kan den målte initiale biomassekoncentration anvendes. Desuden foretages trinvis beregning af den specifikke væksthastighed for hver dag af testen (dag 0-1, 1-2 og 2-3), og det undersøges, om væksthastigheden i kontrollen forbliver konstant (se validitetskriterierne i punkt 11). Er den specifikke væksthastighed væsentligt lavere på dag et end den totale gennemsnitlige specifikke væksthastighed, kan dette tyde på, at der er tale om en lag-fase. Mens en lag-fase i kontrolkulturerne kan minimeres og i praksis elimineres ved korrekt formering af forkulturen, kan en lag-fase i eksponerede kulturer tyde på, at der er tale om restitution efter indledende toksisk stress, eller at eksponeringen efter den initiale eksponering er mindsket på grund af tab af testkemikalie (herunder sorption på algebiomassen). Trinvis beregning af væksthastigheden kan derfor anvendes til at vurdere testkemikaliets virkninger i eksponeringsperioden. Væsentlige forskelle mellem den trinvist beregnede væksthastighed og den gennemsnitlige væksthastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig.

50. Den procentuelle hæmning af væksthastigheden beregnes for hver behandlingsreplikat af ligningen [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2]$$

hvor:

$\%\ I_r$ = procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μ_C = middelværdi af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (μ) i kontrolgruppen

μ_T = gennemsnitlig specifik væksthastighed for behandlingsreplikaten.

51. Når der anvendes opløsningsmiddel til fremstilling af testopløsningerne, skal hæmningen i procent beregnes ved hjælp af opløsningsmiddelkontroller i stedet for kontroller uden opløsningsmiddel.

Udbytte

52. Udbytte beregnes som biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start for hver enkelt beholder med kontrol- eller behandlingsprøve. For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent ($\%\ I_y$) kan beregnes for hver behandlingsreplikat som følger:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

hvor:

$\%\ I_y$ = udbyttehæmning i procent

Y_C = gennemsnitligt udbytte i kontrolgruppen

Y_T = størrelsen af udbyttet for behandlingsreplikaten.

Optegning af koncentrationsresponskurve

53. Hæmningen i procent afsættes som funktion af logaritmen til testkemikaliekoncentrationen, og grafen undersøges nøje, idet der ses bort fra alle datapunkter, der er udpeget som afvigende i første fase. Der lægges en jævn linje gennem datapunkterne, enten i fri hånd eller med computerinterpolation, for at få et første indtryk af sammenhængen mellem koncentration og respons, hvorefter der fortsættes med en mere dybtgående metode, fortrinsvis en computerbaseret statistisk metode. Afhængigt af den påtænkte anvendelse af data, dataenes kvalitet (præcision) og mængde samt adgangen til dataanalyseværktøjer kan det blive besluttet (undertiden med god grund) at standse dataanalysen på dette trin og blot aflæse nøgletallene EC_{50} og EC_{10} (og/eller EC_{20}) på frihåndskurven (se også afsnittet nedenfor om stimulerende virkninger). Af gyldige grunde til ikke at benytte en statistisk metode kan nævnes:

— Dataene er ikke egnede til at give mere pålidelige resultater ved hjælp af computermetoder end ved et fagligt skøn — nogle computerprogrammer kan i sådanne situationer endda være ude af stand til at finde en pålidelig løsning (f.eks. hvis iterationen ikke konvergerer).

— Stimuleret vækstrespons kan ikke behandles fyldestgørende med de forhåndenværende computerprogrammer (se nedenfor).

Statistiske metoder

54. Målet er at formulere den kvantitative sammenhæng mellem koncentration og respons ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (8), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger bedre. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (8). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på kvantale data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne håndtere vækst- eller biomassedata. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x-værdier ud fra kontinuerlige data findes i henvisning (9), (10) og (11). Brugen af ikke-lineær regressionsanalyse er nærmere beskrevet i tillæg 5.

55. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes sammenhængen mellem koncentration og respons til at beregne punktestimater for EC_x-værdier. Når det er muligt, skal der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages på responsværdierne for de enkelte replikater, ikke på behandlingsgruppegennemsnit. Hvis ikke-lineær kurvetilpasning er vanskelig eller umulig på grund

▼M6

af for stor spredning i dataene, kan problemet omgås ved udførelse af regressionen på gruppegennemsnittet som en praktisk måde at mindske indflydelsen fra formodet afvigende værdier på. Når denne mulighed udnyttes, skal det i testrapporten anføres, at der her er afveget fra den normale procedure, fordi kurvetilpasning med de enkelte replikater ikke har givet et godt resultat.

56. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (13).

57. For at beregne et estimat for LOEC og dermed NOEC og testkemikaliets virkninger på væksthastigheden må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan eventuelt bruges (12) (14) (15) (16) (17). Det må vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (17). Hertil kan Levenes eller Bartletts test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (11).

58. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater EC_x. Der er ikke fastlagt en passende værdi for x til denne algetest. Et område på 10 til 20 % synes at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20}.

Vækststimulation

59. Ved lave koncentrationer ses undertiden vækststimulation (negativ hæmning). Dette kan enten skyldes hormese (»toksisk stimulation«), eller at der er tilsat stimulerende vækstfaktorer sammen med testmaterialet til det anvendte minimalsubstrat. Bemærk, at tilsætning af uorganiske næringsstoffer ikke skulle have nogen direkte virkning, da testmediet skal indeholde overskud af næringsstoffer under hele testen. Sædvanligvis kan der ses bort fra lavdosisstimulation i EC_{50}-beregninger, medmindre den er ekstrem. Er den ekstrem, eller skal der beregnes en EC_x-værdi for en lav x-værdi, kan særlige procedurer dog være nødvendige. Om muligt bør det undgås at lade stimulerende responsværdier udgå af dataanalysen, og kan den forhåndenværende kurvetilpasningssoftware ikke acceptere en lav grad af stimulation, kan der anvendes lineær interpolation med bootstrapping. Hvis stimulationen er ekstrem, kan det overvejes at anvende en hormese-model (18).

Ikke-toksisk væksthæmning

60. Lysabsorberende teststoffer kan nedsætte væksthastigheden, fordi de ved at skygge mindsker den tilgængelige lysmængde. Sådanne fysiske virkninger må adskilles fra toksiske virkninger ved ændring af testbetingelserne og skal rapporteres særskilt. Vejledning findes i (2) og (3).

TESTRAPPORT

61. Testrapporten skal indeholde følgende:

▼**M6**

Testkemikalie:

— fysisk tilstand og relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed

— kemiske identifikationsdata (f.eks. CAS-nr.), herunder renhed (urenheder).

Testede arter:

— stamme, leverandør eller kilde og anvendte dyrkningsbetingelser.

Testbetingelser:

— startdato og varighed for testen

— beskrivelse af testens design: testbeholdere, kulturvolumen, biomassetæthed ved testens start

— substratets sammensætning

— testkoncentrationer og replikater (f.eks. antal replikater, antal testkoncentrationer og den anvendte geometriske progression)

— beskrivelse af fremstillingen af testopløsningerne, herunder brug af opløsningsmiddel osv.

— dyrkningsapparatur

— lysintensitet og -kvalitet (kilde, homogenitet)

— temperatur

— testede koncentrationer: de nominelle testkoncentrationer og alle resultater af bestemmelser af testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne. Metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænse i testmatrixen skal rapporteres

— alle fravigelser af nærværende testmetode

— metode til bestemmelse af biomasse og påvisning af korrelation mellem den målte parameter og tørvægten.

Resultater:

— pH-værdi ved testens start og slutning for alle behandlinger

— biomasse for hver kolbe ved hvert målepunkt samt metode til måling af biomasse

— vækstkurver (biomasse som funktion af tiden)

— beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne

— grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning

▼M6

— estimater for toksiciteten for responsvariablene, f.eks. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at bestemme dem

— hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindst signifikante forskel),

— enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling

— eventuelle andre observerede virkninger, f.eks. morfologiske ændringer af algerne

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

(1) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1993), ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.

(2) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1998), ISO/DIS 14442, Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Satety Publitations, Series on Testing and Assessment No. 23, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

(4) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1998), ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) P. Mayer, R. Cuhel og N. Nyholm (1997), A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests, *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) R. E. Slovacey og P. J. Hanna (1997), In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925.

(7) S. L. Simpson, M. G. E. Roland, J. L. Stauber og G. E. Batley (2003), Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints, *Environ. Toxicol. Chem*. 22: 2073-2079.

(8) E. R. Christensen og N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Env. Sci. Technol*, 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

▼M6

(12) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statist. Assoc*, 50: 1096-1121.

(13) Norberg-King T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(14) C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20: 482-491.

(15) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27: 103-117.

(16) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28: 519-531.

(17) N. R. Draper og H. Smith (1981), Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, New York.

(18) P. Brain og R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner og forkortelser anvendes i denne testmetode:

Biomasse er tørvægten af levende materiale, som er til stede i en population, i et givet volumen, f.eks. mg alger/liter testopløsning. »Biomasse« defineres sædvanligvis som masse, men skal i denne test forstås som masse pr. volumenenhed. I denne test anvendes typisk målinger af surrogater for biomasse som f.eks. celletal, fluorescens mv., hvorfor betegnelsen »biomasse« ligeledes dækker disse surrogatmåleværdier.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Variationskoefficient er et dimensionsløst mål for variabiliteten af en parameter, defineret som forholdet mellem standardafvigelsen og middelværdien. Den kan også angives i procent. Middelværdien af variationskoefficienten for den gennemsnitlige specifikke vækshastighed i kontrolkulturreplikater beregnes som følger:

1. Variationskoefficienten beregnes som % af den gennemsnitlige specifikke vækshastighed ved hjælp af de trinvist beregnede daglige vækstrater for den pågældende replikat.

2. Der beregnes et gennemsnit af alle værdier beregnet i punkt 1. Deraf fås den gennemsnitlige variationskoefficient for den beregnede trinvise daglige specifikke vækstrate i kontrolkulturreplikater.

EC_x er den koncentration af testkemikalie opløst i testsubstratet, der medfører en vækshæmning på x % (f.eks. 50 %) af testorganismen inden for en angiven eksponeringsperiode (som angives udtrykkeligt, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis vækshastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for vækshastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield).

Næringssubstrat er det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvori algerne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testsubstratet.

Vækshastighed (gennemsnitlig specifik vækshastighed) er den logaritmiske biomasseforøgelse i eksponeringsperioden.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) er den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning, der mindst svarer til den, som iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Nuleffektkoncentration (No Observed Effect Concentration, NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

Responsvariabel er en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målte parametre, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende testmetode er vækshastigheder og udbytte responsvariable, der er afledt ved måling af biomasse direkte eller af et af de nævnte surrogater.

▼**M6**

Specifik væksthastighed er en responsvariabel, der er defineret som forholdet mellem ændringen i den naturlige logaritme for en observationsparameter (i nærværende testmetode, biomasse) og det tilsvarende tidsrum.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Udbytte er værdien af en målevariabel ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variablen ved eksponeringsperiodens start, dvs. stigningen i biomasse under testen.

▼M6

Tillæg 2

Stammer, der er påvist at være velegnede til testen

Grønalger

Pseudokirchneriella subcapitata (tidligere benævnt Selenastrum capricornutum), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (tidligere benævnt Scenedesmus subspicatus), 86.81 SAG

Diatoméer

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobakterier

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Kilder til stammer

De anbefalede stammer fås som monokulturer fra følgende samlinger (i alfabetisk rækkefølge):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Det Forenede Kongerige

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
TYSKLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M6

Udseende og karakteristika af anbefalede arter

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Udseende	Krumme, skrueformede enkeltceller	Ovale, hovedsagelig enkeltceller	Stave	Kæder af ovale celler	Stave
Størrelse (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Cellevolumen (μm^3/celle)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Tørvægt af celle (mg/celle)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Vækshastighed (3) (dag^{-1})	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 - 2,4

(1) Målt med elektronisk partikeltæller
(2) Beregnet af størrelsen
(3) Hyppigste observerede vækshastighed i OECD-substrat ved en lysintensitet på ca. 70 µE m^{-2} s^{-1} og 21 °C

Særlige anbefalinger for dyrkning og håndtering af de anbefalede testarter

Pseudokirchneriella subcapitata og Desmodesmus subspicatus

Disse grønalgearter er sædvanligvis lette at holde i forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Cellerne er normalt solitære, og måling af celletætheden kan let foretages med elektronisk partikeltæller eller i mikroskop.

Anabaena flos-aquae

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Det er især vigtigt at undgå, at batchkulturen kommer ud af den logaritmiske vækstfase, når den udskiftes, da restitution på dette punkt er vanskelig.

Anabaena flos-aquae udvikler aggregater af sammenfiltrede kæder af celler. Størrelsen af aggregaterne kan være forskellig, afhængigt af dyrkningsbetingelserne. Det kan være nødvendigt at bryde sådanne aggregater op, før biomassen kan bestemmes ved tælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller.

For at nedsætte variabiliteten af tællingerne kan kæderne brydes op ved sonikering af delprøver. Hvis sonikeringen fortsættes længere end nødvendigt for at bryde kæderne til kortere længder, kan cellerne blive ødelagt. Intensitet og varighed af sonikeringen skal være ens for alle behandlinger.

For at medvirke til at kompensere for variabiliteten skal der tælles et tilstrækkeligt antal felter på hæmocytometeret (mindst 400 celler). Derved fås mere pålidelige tæthedsbestemmelser i mikroskop.

Til bestemmelse af det totale cellevolumen af Anabaena kan en elektronisk partikeltæller anvendes efter forudgående forsigtig sonikering for at bryde cellekæderne. Sonikeringsenergien skal tilpasses, så bristning af celler undgås.

Ved hjælp af hvirvelomrører eller en tilsvarende velegnet metode skal det sikres, at den anvendte algesuspension til podning af testbeholderne er godt opblandet og homogen.

▼**M6**

Testbeholderne anbringes på et roterende eller frem- og tilbagegående rystebord ved ca. 150 omdr./min. I stedet kan der anvendes intermitterende omrystning for at mindske Anabaenas tilbøjelighed til sammenklumpning. I tilfælde af sammenklumpning skal der drages omsorg for, at prøverne til biomassebestemmelse bliver repræsentative. Energisk omrystning kan være nødvendig før prøvetagning for at skille algeklumperne ad.

Synechococcus leopoliensis

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne.

Synechococcus leopoliensis vokser som solitære, stavformede celler. Cellerne er meget små, hvilket komplicerer tælling i mikroskop til biomassebestemmelse. Elektroniske partikeltællere, der er udstyret til tælling af partikler ned til ca. 1 μm, er gode. In vitro fluorometrisk måling kan ligeledes anvendes.

Navicula pelliculosa

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Bemærk, at substratet skal indeholde silikat.

Navicula pelliculosa kan danne aggregater under visse vækstbetingelser. På grund af dannelse af lipider vil algecellerne undertiden have tendens til at akkumulere i overfladefilmen. Under sådanne omstændigheder må der ved udtagning af delprøver til biomassebestemmelse træffes særlige foranstaltninger for at sikre, at prøverne er repræsentative. Det kan være nødvendigt med kraftig omrystning, f.eks. med en hvirvelomrører.

▼M6

Tillæg 3

Næringssubstrater

Et af nedenstående to næringssubstrater kan anvendes:

— OECD-substrat: Det oprindelige substrat fra OECD TG 201, også i henhold til ISO 8692

— US. EPA-substrat AAP, ligeledes i henhold til ASTM.

Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Sammensætning af AAP-substratet (US. EPA) og OECD TG 201-substratet.

Komponent	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Det molære forhold mellem EDTA og jern er lidt over 1. Derved undgås udfældning af jern, samtidig med at chelatering af tungmetalioner minimeres.

I testen med diatoméen Navicula pelliculosa skal begge substrater suppleres med $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ til en koncentration på 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Substratets pH opnås ved ligevægt mellem substratets carbonatsystem og partialtrykket af CO_2 i atmosfærisk luft. En omtrentlig sammenhæng mellem pH ved 25 °C og den molære bicarbonatkoncentration er givet ved:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Ved 15 mg $NaHCO_3$/l er pH_{eq} = 7,5 (U.S. EPA-substrat), og ved 50 mg $NaHCO_3$/l er pH_{eq} = 8,1 (OECD-substrat).

Testsubstraternes sammensætning af grundstoffer

Grundstof	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Fremstilling af OECD-substrat

Næringsstof	Koncentration i stamopløsning
Stamopløsning 1: makronæringsstoffer	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stamopløsning 2: jern	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Stamopløsning 3: sporstoffer	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Næringsstof	Koncentration i stamopløsning
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Stamopløsning 4: bicarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Stamopløsningen steriliseres ved membranfiltrering (middelporediameter 0,2 μm) eller autoklavering (120 °C, 15 min). Opløsningerne opbevares i mørke ved 4 °C.

Stamopløsning 2 og 4 må ikke autoklaveres, men skal steriliseres ved membranfiltrering.

Næringssubstrater fremstilles ved tilsætning af et passende volumen stamopløsning 1-4 til vand:

Til 500 ml steriliseret vand tilsættes der:

10 ml stamopløsning 1

1 ml stamopløsning 2

1 ml stamopløsning 3

1 ml stamopløsning 4

Der tilsættes steriliseret vand til 1 000 ml.

Giv substratet tid til at ækvilibrere med atmosfærens CO_2, om nødvendigt ved nogle timers gennembobling med sterilfiltreret luft.

Fremstilling af U.S. EPA-substrat

1. 1 ml af hver stamopløsning i *2.1–2.7* tilsættes til ca. 900 ml deioniseret eller destilleret vand og fortyndes derefter til 1 liter.

2. Stamopløsninger af makronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand. Reagens *2.1, 2.2, 2.3* og *2.4* kan kombineres til en stamopløsning.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g
2.4	Stamopløsning af mikronæringsstoffer (se 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Se bemærkning 1.

▼**M6**

Bemærkning 1: Anvendes kun til diatomé-testarter. Kan tilsættes direkte (202,4 mg) eller som stamopløsning til en endelig Si-koncentration i substratet på 20 mg/l.

3. Stamopløsningen af mikronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg	
3.5	$CoCl_2 \cdot 6H2O$	0,714 mg	
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg	[dinatrium-(ethylendinitrilo)-tetraacetat]
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg,	se bemærkning 2.

Bemærkning 2: Bruges kun i substrat til stamkulturer af diatoméarter.

4. pH justeres til 7,5 ± 0,1 med 0,1 *N* eller 1,0 *N* NaOH eller HCl.

5. Substratet filtreres over i en steril beholder, enten gennem et 0,22 μm membranfilter, hvis der skal bruges partikeltæller, eller et 0,45 μm filter, hvis der ikke skal bruges partikeltæller.

6. Substratet opbevares i mørke ved ca. 4 °C, til det skal bruges.

▼M6

Tillæg 4

Eksempel på fremgangsmåde ved dyrkning af alger

Almindelige bemærkninger

Formålet med dyrkningen efter følgende metode er at fremstille algekulturer til toksicitetstest.

Det skal ved hjælp af egnede metoder sikres, at algekulturerne ikke er inficeret med bakterier. Axeniske kulturer kan være ønskeligt, men der skal fremstilles og anvendes monokulturer af alger.

Alle operationer skal udføres med steril teknik for at undgå kontaminering med bakterier og andre alger.

Udstyr og materialer

Se under testmetode: Apparatur

Metode til fremstilling af algekulturer

Fremstilling af næringssubstrater (medier)

Alle næringssalte i substratet fremstilles som koncentrerede stamopløsninger, der opbevares mørkt og koldt. Disse opløsninger steriliseres ved filtrering eller autoklavering.

Substratet fremstilles ved, at den korrekte mængde stamopløsning sættes til destilleret vand, idet der udvises omhu for at undgå kontaminering. Til faste substrater tilsættes 0,8 procent agar.

Stamkultur

Stamkulturerne er små algekulturer, som regelmæssigt overføres til frisk substrat, og som benyttes som udgangsmateriale til testen. Hvis disse kulturer ikke anvendes regelmæssigt, stryges de ud på skråagar. Sådanne kulturer overføres til frisk substrat mindst hver anden måned.

Stamkulturerne dyrkes i koniske kolber med et egnet substrat (volumen ca. 100 ml). Dyrkes algerne ved 20 °C med kontinuerlig belysning, er overførsel en gang ugentligt påkrævet.

Ved overførslen overføres en mængde af den »gamle« kultur med sterile pipetter til en kolbe med frisk substrat, så startkoncentrationen for hurtigtvoksende arter er ca. 100 gange mindre end i den gamle kultur.

En arts vækshastighed kan bestemmes ud fra vækstkurven. Hvis denne kendes, kan man skønne, ved hvilken tæthed kulturen må overføres til et nyt substrat. Dette skal gøres, før kulturen når dødsfasen.

Forkultur

Forkulturen har til formål at give en passende algemængde til podning af test-kulturerne. Forkulturer inkuberes under testbetingelserne og tages i anvendelse, medens væksten stadig er eksponentiel, normalt efter 2-4 dage. Algekulturer, der indeholder deforme eller abnorme celler, kasseres.

▼M6

Tillæg 5

Dataanalyse ved ikke-lineær regression

Generelle betragtninger

Responsen i algetest og andre test af mikrobiel vækst — vækst af biomasse — er i sig selv en kontinuert eller metrisk variabel — en proceshastighed, når vækst-hastigheden anvendes, og integralet af væksthastigheden med hensyn til tiden, når biomasse vælges. Begge henføres til den tilsvarende gennemsnitsrespons for ikke-eksponerede kontrolreplikater, der udviser maksimal respons ved de anvendte betingelser — med lys og temperatur som de primære bestemmende faktorer i algetesten. Systemet er distribueret eller homogent, og biomassen kan betragtes som en helhed uden hensyn til enkeltceller. Variansfordelingen for den type respons, der ses i et sådant system, afhænger udelukkende af eksperimentelle faktorer (dette beskrives typisk ved, at fejlen er log-normalfordelt eller normalfordelt). Dette er modsat typiske bioassay-responser med kvantale data, hvor det dominerende bidrag til variansen ofte antages at være de enkelte organismers tolerance (der typisk er binomialfordelt). Responsen fra kontrollerne er her nulniveau eller baggrundsniveau.

I det ukomplicerede tilfælde aftager den normaliserede eller relative respons, r, monotont fra 1 (ingen hæmning) til 0 (100 procents hæmning). Bemærk, at der til alle responser er knyttet en fejl, og at tilsyneladende negative hæmningsværdier ved beregningen kan tilskrives tilfældige fejl alene.

Regressionsanalyse

Modeller

Med regressionsanalyse tilstræbes det at beskrive koncentrationsresponskurven som en matematisk regressionsfunktion $Y = f(C)$ eller oftere $F(Z)$, hvor $Z = \log C$. Med den omvendte funktion $C = f^{-1}(Y)$ kan der beregnes EC_x-værdier, herunder EC_{50}, EC_{10} og EC_{20}, med tilhørende 95 % konfidensgrænser. Flere forskellige enkle matematiske funktioner har vist sig velegnede til at beskrive den koncentrationsresponssammenhæng, der optræder i vækshæmningstest med alger. Af sådanne funktioner kan nævnes den logistiske ligning, den asymmetriske Weibull-ligning og log-normalfordelingsfunktionen, der alle er S-formede kurver, der asymptotisk går mod nul for $C \rightarrow 0$, og mod en for $C \rightarrow$ uendeligt.

Anvendelse af modeller med kontinuerte tærskelfunktioner (f.eks. »the Kooijman model for inhibition of population growth« Kooijman et al. 1996) er for nylig blevet foreslået som et alternativ til asymptotiske modeller. I denne model antages, at der ikke er nogen virkninger ved koncentrationer under en bestemt tærskel, EC_0+, som estimeres ved at ekstrapolere responskoncentrationsforholdet til skæring med koncentrationsaksen ved hjælp af en simpel kontinuert funktion, der ikke er differentiabel i udgangspunktet.

Bemærk, at analysen kan bestå i en simpel minimering af summer af residual-kvadrater (når variansen forudsættes konstant) eller af vægtede kvadrater, når der kompenseres for variansheterogenitet.

Fremgangsmåde

Fremgangsmåden kan sammenfattes således: Der vælges en passende funktion, $Y = f(C)$, som tilpasses til dataene ved ikke-lineær regression. Det må foretrækkes at anvende målinger fra hver enkelt kolbe frem for gennemsnitsværdier for replikaterne, da man derved får mest mulig information fra dataene. Hvis

▼M6

variansen derimod er høj, tyder praktisk erfaring på, at der ved brug af gennemsnitsværdier af replikaterne fås en mere robust matematisk beregning, der er mindre påvirkelig af systematiske fejl i data end bibeholdelse af de enkelte datapunkter.

Den tilpassede kurve og de målte data afsættes, og det undersøges, om tilpasningen af kurven er tilfredsstillende. Analyse af residualer kan være et særdeles nyttigt redskab til dette formål. Hvis den valgte funktion for koncentrationsresponssammenhængen ikke beskriver hele kurven eller en vigtig del af denne som f.eks. responsen i koncentrationslavpunktet, vælges en anden mulighed for kurvetilpasning — f.eks. en ikke-symmetrisk kurve som Weibul-funktionen i stedet for en symmetrisk. Negativ hæmning kan være et problem ved brug af f.eks. log-normalfordelingsfunktionen, så der også her er brug for en alternativ regressionsfunktion. Det kan ikke anbefales at tildele en nulværdi eller en lille positiv værdi til sådanne negative værdier, da det forvrænger fejlfordelingen. Det kan være hensigtsmæssigt at foretage separate kurvetilpasninger, f.eks. på den del af kurven, hvor hæmningen er lille, for at beregne et estimat for $EC_{low\ x}$-værdierne. Af den tilpassede ligning beregnes (ved »omvendt beregning«, $C = f^{-1}(Y)$) karakteristiske punktestimater EC_x, og som minimum rapporteres EC_{50}-værdien og et eller to estimater for $EC_{low\ x}$. De praktiske erfaringer fra testene har vist, at algetesten sædvanligvis er tilstrækkelig præcis til at give et rimelig nøjagtigt estimat ved 10 % hæmning, hvis der er tilstrækkeligt med datapunkter — medmindre der ved lave koncentrationer optræder stimulation som konfunderende faktor. Nøjagtigheden af et estimat for EC_{20} er ofte betydeligt bedre end af en EC_{10}-værdi, da EC_{20} sædvanligvis ligger på den tilnærmelsesvis lineære del af den centrale del af koncentrationsresponskurven. Undertiden kan EC_{10} være vanskelig at fortolke på grund af vækststimulation. Selv om EC_{10} således normalt fås med tilstrækkelig nøjagtighed, anbefales det således, at man desuden altid rapporterer EC_{20}-værdien.

Vægtningsfaktorer

Den eksperimentelle varians er sædvanligvis ikke konstant, men indeholder typisk en proportional komponent, hvorfor rutinemæssig brug af vægtet regression vil være en fordel. Vægtningsfaktorerne til en sådan analyse antages normalt at være omvendt proportionale med variansen:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Mange regressionsprogrammer kan bruges til vægtet regressionsanalyse med vægtningsfaktorer angivet i en tabel. For nemheds skyld bør vægtningsfaktorerne normaliseres ved multiplikation med $n/\Sigma\ w_i$ (hvor n er antallet af datapunkter), således at deres sum bliver lig en.

Normalisering af respons

Normalisering med gennemsnitsresponsen i kontrollerne medfører visse principielle problemer foruden en ret kompliceret variansstruktur. Når responsværdierne divideres med kontrollernes gennemsnitsrespons for at få hæmningen i procent, indføres derved en ekstra fejl, der skyldes fejlen på middelværdien for kontrollerne. Medmindre denne fejl er ubetydelig, skal vægtningsfaktorerne i regressionen og konfidensgrænserne korrigeres for kovarians med kontrollen (Draper og Smith, 1981). Bemærk, at det er vigtigt med en høj præcision af estimatet for middelværdien af responsen i kontrollerne, for at den samlede varians af den relative respons kan blive minimeret. Denne varians kan angives således:

(indeks i henviser til koncentrationsniveau i og indeks 0 til kontrollerne)

$$Yi = \text{Relativ respons} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

med variansen $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial\ Yi\ /\ \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

og, eftersom $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_i) = 1/r_0$, og $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

med normalfordelte data og replikaterne m_i og m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

bliver den totale varians af den relative respons Y_i

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^{\ 2} \cdot m_i) + r_i^{\ 2} \cdot \sigma^2/r_0^{\ 4} \cdot m_0$$

Fejlen på middelværdien for kontrollerne er omvendt proportional med kvadratroden af det antal replikater af kontrollerne, som gennemsnittet er beregnet af, og undertiden kan det være berettiget at medtage historiske data for på denne måde at mindske fejlen stærkt. En alternativ metode er at undlade normalisering af dataene og i stedet tilpasse de absolutte responsværdier, også responsdata for kontrollerne, men herved indføres responsværdien for kontrollerne som en ekstra parameter, der skal indgå i tilpasningen ved ikke-lineær regression. Med en sædvanlig to-parameters regressionsligning kræver denne metode tilpasning af tre parametre og dermed flere datapunkter end ikke-lineær regression på data, der er normaliseret med en forud fastlagt respons for kontrollerne.

Omvendte konfidensintervaller

Beregning af konfidensintervaller i ikke-lineær regression ved hjælp af omvendt estimation er ret kompliceret og hører ikke til standardvalgene i almindelige statistikprogrampakker. Tilnærmede konfidensgrænser kan beregnes med standardprogrammer til ikke-lineær regression med re-parameterisering (Bruce og Versteeg, 1992), hvorved den matematiske ligning omskrives med de ønskede punktestimater, f.eks. med EC_{10} og EC_{50} som de parametre, der skal estimeres. (Lad funktionen være I = f (α, β, koncentration), og benyt definitionsrelationerne f (α, β, EC_{10}) = 0,1 og f (α, β, EC_{50}) = 0,5 til at erstatte funktionen f (α, β, koncentration) med den ækvivalente funktion g (EC_{10}, EC_{50}, koncentration).

En mere direkte beregning (Andersen et al., 1998) foretages ved at bibeholde den oprindelige ligning og bruge Taylor-udvikling omkring middelværdierne af r_i og r_0.

På det seneste har »boot strap«-metoder vundet udbredelse. I sådanne metoder estimeres en empirisk variansfordeling ved hjælp af de målte data sammen med hyppig resampling, der styres af en generator af vilkårlige tal.

REFERENCER

S. A. L. M. Kooijman, A. O. Hanstveit og N. Nyholm (1996), No-effect concentrations in algal growth inhibition tests, *Water Research*, 30, 1625-1632.

N. R. Draper og H. Smith (1981), Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, New York.

R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

J. S. Andersen, H. Holst, H. Spliid, H. Andersen, A. Baun og N. Nyholm (1998), Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response, *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. BESTEMMELSE AF »LET« BIONEDBRYDELIGHED

DEL I. GENERELLE BETRAGTNINGER

I.1. INDLEDNING

Der er beskrevet seks metoder til screening af kemikalier for let bionedbrydelighed i aerobt vandigt miljø:

a) Eliminering af opløst organisk kulstof (DOC) (metode C.4-A)

b) Modificeret OECD-screeningtest — eliminering af DOC (metode C.4-B)

c) Kuldioxidudvikling (modificeret Sturm-test) (metode C.4-C)

d) Manometrisk respirometri (metode C.4-D)

e) Closed Bottle Test (metode C.4-E)

f) MITI-test (Ministry of International Trade and Industry — Japan) (metode C.4-F)

Del I indeholder generelle betragtninger og betragtninger, der gælder for alle seks test. I del II-VII findes de punkter, der er specifikke for de enkelte test. Tillæggene indeholder definitioner, formler og vejledende oplysninger.

I 1988 gennemførte OECD en ringtest, som viste, at metoderne giver indbyrdes overensstemmende resultater. Imidlertid kan en bestemt metode foretrækkes, alt efter det undersøgte stofs fysiske egenskaber.

I.2. VALG AF METODE

For at kunne vælge den bedst egnede metode er det afgørende at have kendskab til kemikaliets opløselighed, damptryk og adsorptionsegenskaber. Den kemiske struktur eller formel bør kendes for at kunne beregne den teoretiske værdi og/eller kontrollere målte værdier af parametre som f.eks. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC og COD (se bilag I og II).

Testkemikalier, der er opløselige i vand med mindst 100 mg/l og ikke-flygtige og ikke-adsorberende, kan vurderes ved alle metoderne. Af tabel 1 fremgår, hvilke metoder der er egnede for kemikalier, der er tungtopløselige i vand, flygtige eller adsorberende. I bilag III er det beskrevet, hvordan man kan bære sig ad med tungt vandopløselige og flygtige kemikalier. Kemiske stoffer med moderat flygtighed kan testes i DOC-henfaldsmetoden, hvis der er tilstrækkelig luftrum i testbeholderen (som skal tillukkes passende). I dette tilfælde skal der benyttes en abiotisk kontrolkolbe, som tillader ethvert fysisk tab.

▼B

Tabel 1

Testmetodernes anvendelsesområder

Test	Analysemetode	Egnet til stoffer, der er:		
		tungt opløselige	flygtige	adsorberende
DOC-eliminering	Opløst organisk kulstof	–	–	±
Mod. OECD DOC-elim.	Opløst organisk kulstof	–	–	±
CO_2-udvikling	Respirometri: CO_2-udvikling	+	–	+
Manometrisk respirometri	Manometrisk respirometri: oxygenforbrug	+	±	+
Closed Bottle	Respirometri: opløst oxygen	±	+	+
MITI	Respirometri: oxygenforbrug	+	±	+

Oplysninger om testmaterialets renhed eller forholdet mellem dets hovedtebstanddele er nødvendige for fortolkning af de fundne resultater, især hvis de er små eller usikre.

Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for bakterier (bilag IV) kan være til nytte ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

I.3. REFERENCESTOFFER

Til kontrol af fremgangsmåden benyttes der referencestoffer, som opfylder kriterierne for let bionedbrydelighed, og som testes i en separat kolbe parallelt med de øvrige prøver.

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat og natriumbenzoat er egnede kemikalier. Alle disse referencekemikalier nedbrydes ved disse metoder, selv når der ikke tilsættes inoculum.

Det har været fremført, at man burde finde frem til et referencekemikalie, der er let nedbrydeligt men kræver tilsætning af inoculum, selv i Closed Bottle-metoden. Kaliumhydrogenphthalat har været foreslået, men der mangler endnu konkret bevis med dette stof, før det kan accepteres som et referencestof.

I metoder, der er baseret på respirometri, kan nitrogenholdige forbindelser påvirke oxygenoptagelsen på grund af nitrifikation (se bilag II og V).

I.4. TESTMETODERNES PRINCIP

Teststoffet opløses eller opslæmmes i et uorganisk medium, inoculeres og inkuberes under aerobe forhold i mørke eller dæmpet lys. Den del af DOC i opløsningen, der stammer fra inoculum, skal være så lavt som muligt i forhold til den del, der stammer fra teststoffet. Der tages hensyn til inoculums endogene aktivitet ved at køre parallelle blindprøver med inoculum men uden teststof i opløsningen, selvom cellernes endogene aktivitet under tilstedeværelse af stoffet ikke præcis svarer til denne i den endogene kontrol. Et referencestof benyttes parallelt for at kontrollere, hvorledes procedurerne fungerer.

▼B

I reglen følges nedbrydningen ved bestemmelse af parametre såsom DOC, CO_2-dannelse og oxygenoptagelse, og der foretages målinger med tilstrækkeligt hyppige intervaller, således at begyndelsen og afslutningen af bionedbrydningen kan identificeres. Med automatiske respirometre sker målingen kontinuerligt. Undertiden måles både DOC og en anden parameter, men det er normalt kun tilfældet ved testens begyndelse og slutning. Der kan også anvendes specifik kemisk analyse til bedømmelse af den primære nedbrydning af teststoffet og til bestemmelse af koncentrationen af eventuelle mellemprodukter (obligatorisk i MITI-testen).

Normalt løber testen over 28 dage. Når bionedbrydningskurven har nået et plateau ved mindst tre målinger, kan testen dog afbrydes. Hvis kurven viser, at bionedbrydningen er begyndt men ikke har nået et plateau inden de 28 dage, kan testen forlænges ud over denne periode.

I.5. KVALITETSKRITERIER

I.5.1. **Reproducerbarhed**

Som følge af bionedbrydningens natur og den blandede bakteriepopulation i inoculum, foretages der mindst dobbeltbestemmelse.

Den almindelige erfaring er, at variationen mellem gentagelser bliver mindre, desto større startkoncentrationen af mikroorganismer i testmediet er. Ringtest har desuden vist, at der kan være betydelige forskelle mellem de resultater, forskellige laboratorier når frem til, men der opnås generelt god overensstemmelse med let bionedbrydelige forbindelser.

I.5.2. **Testens gyldighed**

En test anses for gyldig, hvis forskellene mellem de to yderste værdier for teststoffets forsvinden ved en multibestemmelse i plateau-fasen, ved afslutningen af testen eller ved afslutningen af 10 døgns-vinduet er mindre end 20 %, og hvis den procentvise nedbrydning af referencestoffet har nået niveauet for let bionedbrydelighed inden for 14 dage. Hvis ikke begge betingelser er opfyldt, gentages testen. Da metoderne er ret strikse, betyder lave værdier ikke nødvendigvis, at stoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøforhold, men at der kræves yderligere arbejde til bestemmelse af bionedbrydeligheden.

Er nedbrydningen i en toksicitetstest med både teststof og referencekemikalie mindre end 35 % (baseret på DOC) eller 25 % (baseret på ThOD eller $ThCO_2$) på 14 dage, må testkemikaliet antages at være hæmmende (se også bilag IV). Testrækken gentages, om muligt med lavere teststofkoncentration og/eller højere inoculumkoncentration, dog højst 30 mg tørstof pr. liter.

I.6. GENERELLE PROCEDURER

De generelle betingelser for testene er sammenfattet i tabel 2. Apparatur og forsøgsomstændigheder, der er specifikke for en bestemt test, er beskrevet senere under den pågældende test.

▼B

Tabel 2

Testbetingelser

Test	DOC-elimine-ring	CO_2-udvikling	Manometrisk respirometri	Modificeret OECD-scre-ening	Closed Bottle	MITI(I)
Teststofkon-centration						
i mg/t			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Inoculumkon-centration (omtrentligt antal celler pr. liter)	≤ 30 mg/l TS eller ≤ 100 ml spildev and pr. l (10^7-10^8)			0,5 ml sekun-dært spilde-vand pr. l (10^5)	< 5 ml spil-devand pr. l (10^4-10^6)	30 mg/l TS (10^7-10^8)
Grundstofkon-centration i uorganisk medium (i mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					helst 7,0
Temperatur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = opløst organisk kulstof ThOD = teoretisk oxygenfor-brug TS = tørstof i suspension

I.6.1. **Vand**

Det deioniserede eller destillerede vand, der benyttes, må hverken indeholde toksiske stoffer (f.eks. Cu^{++}-ioner) i hæmmende mængder eller organisk kulstof svarende til mere end 10 % af testmaterialets organiske kulstof. Denne høje renhed er nødvendig for at undgik høje blindværdier. Forureninger kan stamme fra naturlige urenheder og fra ionbytterharpikser og lyseret materiale fra bakterier og alger. Til hver testserie anvendes kun én bestemt batch af vand, som i forvejen er kontrolleret ved DOC-analyse. En sådan kontrol er ikke nødvendig for Closed Bottle-testen, men oxygenforbruget fra vandet skal være lavt.

▼B

I.6.2. **Stamopløsninger af uorganiske medium**

Der fremstilles stamopløsninger af uorganiske medier med passende koncentrationer af salte til brug ved fremstilling af testopløsningerne. Følgende stamopløsninger kan (med forskellige fortyndingsforhold) anvendes til DOC-eliminering, modificeret OECD-screening, CO_2-udvikling, manometrisk respirometri og Closed Bottle-test.

Fortyndingsforholdene og for MITI-testens vedkommende fremstilling af det specifikke uorganiske medium, er anført under de enkelte metoder.

Stamopløsninger:

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet:

a) monokaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4 8,50 g

dikaliummonohydrogenorthophosphat, K_2HPO_4 21,75 g

dinatriummonohydrogenorthophosphat dihydrat, $Na_2HPO_4\ 2H_2O$ 33,40 g

ammoniumchlorid, NH_4Cl 0,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Opløsningens pH skal være 7,4.

b) calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$ 27,50 g

eller calciumchlorid dihydrat, $CaCl_2\ 2H_2O$ 36,40 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

c) magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4\ 7H_2O$ 22,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

d) jern(III)chlorid hexahydrat, $FeCl_3\ 6H_20$ 0,25 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

Anmærkning: For at undgå at skulle fremstille denne opløsning umiddelbart før brugen tilsættes der 1 dråbe koncentreret HCl eller 0,40 g ethylendiamintetraeddikesyre dinatriumsalt (EDTA) pr. liter.

I.6.3. **Stamopløsninger af kemikalier**

Hvis opløseligheden er større end 1 g/l opløses f.eks. 1-10 g af test- eller referencekemikalie i deioniseret vand, og der fortyndes til 1 liter. I modsat fald fremstilles stamopløsningen i det uorganiske medium, eller kemikaliet tilsættes direkte til det uorganiske medium. Jf. bilag III for håndtering af mindre opløselige kemikalier; dog må der i MITI-testen (metode C.4-F) hverken anvendes opløsningsmidler eller emulgatorer.

▼B

I.6.4. **Inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder, f.eks. aktivt slam, spildevandsafløb (ikke chloreret), overfladevand og -jord eller en blanding af disse. Aktivt slam til DOC-eliminering, CO_2-udvikling og manometrisk respirometri skal udtages fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der først og fremmest behandler husholdningsspildevand. Inoculum fra andre kilder har vist sig at føre til større spredning af resultaterne. Til den modificerede OECD-screening og Closed Bottle-testen kræves der et mere fortyndet inoculum uden slampartikler, og som kilde foretrækkes sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg for husholdningsspildevand eller et anlæg i laboratorieskala. Til MITI-testen fremstilles inoculum fra en blanding af kilder, hvilket er beskrevet under denne specifikke test.

I.6.4.1. *Inoculum fra aktivt slam*

Der udtages en frisk prøve af aktivt slam fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjern grove partikler fra ved filtrering gennem en finmasket sigte og hold herefter slammet aerobt.

Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten fjernes. Slammet kan vaskes i uorganisk medium. Det koncentrerede slam opslæmmes til en koncentration på 3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.

Slammet skal tages fra et ordentligt fungerende normalt anlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et renseanlæg, som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det genopslæmmede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam genopslæmmes i uorganisk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.

Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt genopslæmmede slam eller af det ubehandlede slam, til bestemmelse af mængden af opslæmmet tørstof.

Et andet alternativ er at homogenisere aktivt slam (3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter). Slammet behandles i en mekanisk blender i 2 min ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i 30 min eller om nødvendigt længere, og væsken dekanteres fra til brug som inoculum i en mængde på 10 ml pr. liter uorganisk medium.

I.6.4.2. *Andre inoculumkilder*

Det kan fremstilles af sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Der udtages en frisk prøve, der opbevares under aerobe forhold under transporten. Den henstår til bundfældning i 1 time eller filtreres gennem et groft.papirfilter, og denne væske opbevares under aerobe forhold indtil brugen. Op til 100 ml af denne inoculumtype kan bruges pr. liter medium.

▼B

Overfladevand er en yderligere inoculumkilde. I dette tilfælde udtages en prøve af egnet overfladevand, f.eks, flod- eller søvand, som opbevares under aerobe forhold indtil anvendelsen. Om nødvendigt kan inoculum koncentreres ved filtrering eller centrifugering.

I.6.5. **Forkonditionering af inoculum**

De fremstillede inocula kan forkonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnes til testkemikaliet. Forkonditioneringen består i beluftning af aktivt slam i uorganisk medium eller af sekundært afløbsvand i 5-7 dage ved stuetemperatur. Undertiden gør forkonditionering metoderne mere præcise, idet blindværdierne reduceres. Det anses for unødvendigt at forkonditionere MITI-inoculum.

I.6.6. **Abiotiske kontrolprøver**

Om nødvendig: foretages der kontrol af eventuel abiotisk nedbrydning af teststoffet ved bestemmelse af DOC-tab, oxygenoptagelse og kuldioxidudvikling i sterile kontrolprøver, der ikke indeholder inoculum. Der steriliseres ved membranfiltrering (0,2 - 0,45 μm); eller ved tilsætning af et passende toksisk stof i passende koncentration. Hvis der benyttes membranfiltrering, skal prøverne tages aseptisk for at opretholde steriliteten. Med mindre adsorption af teststoffet i forvejen er blevet udelukket, skal test, som måler bionedbrydning som DOC-fjernelse, inkludere en abiotisk kontrol, som inoculeres og forgiftes. Dette gælder særligt for inocula med aktiveret slam.

I.6.7. **Antal kolber**

For hver test er antallet af kolber i en typisk forsøgsrække beskrevet under den enkelte metode.

Følgende typer af kolber kan bruges:

— testopslæmning: indeholder teststof og inoculum

— inoculumblind: indeholder kun inoculum

— procedurekontrol: indeholder referencestof og inoculum

— abiotisk steril kontrol: sterile, indeholder teststof (I.6.6)

— adsorptionskontrol: indeholder teststof, inoculum og steriliserende stof

— toksicitetskontrol: indeholder teststof, referencestof og inoculum.

Bestemmelser i testopslæmning og inoculumblind skal obligatorisk foretages sideløbende. Det anbefales ligeledes at foretage sideløbende bestemmelser i den anden kolbe.

Det er dog ikke altid muligt. Man må sørge for, at der udtages tilstrækkeligt med prøver eller foretages tilstrækkeligt mange aflæsninger til, at den procentvise eliminering i 10-dages-vinduet kan vurderes.

▼B

I.7. DATA OG EVALUERING

Ved beregning af den procentvise nedbrydning D_t anvendes gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelserne af parameteren i testopslæmningen og inoculumblindprøven. Formlerne er givet i afsnittene om de enkelte testmetoder. Nedbrydningens forløb vises grafisk med angivelse af 10-dages-vinduet. Den procentvise eliminering ved afslutningen af 10-dages-vinduet og ved plateauet eller testens afslutning beregnes og rapporteres.

I de respirometriske test kan nitrogenholdige forbindelser indvirke på oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation (se bilag II og V).

I.7.1. **Nedbrydning målt ved bestemmelse af DOC**

Den procentuelle nedbrydning (D_t) på ethvert prøvetagningstidspunkt skal beregnes særskildt for kolberne, som indeholder teststof, idet gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelseme af DOC benyttes for at kunne bedømme pålideligheden af testen (se I.5.2). Den beregnes ved at bruge følgende udtryk:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

hvor:

D_t = % nedbrydning til tidspunktet t

C_o = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum (mg DOC/l)

C_t = gennemsnitskoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l)

C_{bo} = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum (mg DOC/l)

C_{bt} = gennemsnitskoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l).

Alle koncentrationer bestemmes eksperimentelt.

I.7.2. **Nedbrydning målt ved specifik analyse**

Når der foreligger specifikke analysedata, beregnes den primære bionedbrydning ved udtrykket:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

hvor

D_t = % nedbrydning til tidspunktet t, normalt 28 dage

S_a = restmængde teststof i medium med inoculum ved testens afslutning (mg)

S_b = restmængde teststof i blindprøve kun med vand/medium og teststof (mg)

▼B

I.7.3. **Abiotisk nedbrydning**

Når en abiotisk kontrol bruges, beregnes den procentuelle abiotiske nedbrydning ved at bruge

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

hvor

$C_{S(0)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag t

I.8. RAPPORTERING

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— test- og referencekemikalier og deres renhed

— testbetingelser

— inoculum: art og udtagningssted(er), koncentration og eventuel forkonditionering

— art og andel af industrispildevand i afløbsvandet, hvis kendt

— testens varighed og temperatur

— for tungt opløselige testkemikalier, den foretagne behandling

— anvendt testmetode; ændringer i fremgangsmåden skal begrundes videnskabeligt

— forsøgsresultater i skema

— eventuelt iagttagne hæmningsfænomener

— eventuelt iagttagen abiotisk nedbrydning

— eventuelle data fra specifikke kemiske analyser

— om muligt analytiske data vedrørende nedbrydningsprodukter

— afbildning af den procentvise nedbrydning mod tiden for både test- og referencestof med tydelig angivelse af lag-periode, nedbrydningstid, 10-dages-vindue og hældning (se bilag I). Hvis der i testen benyttes pålidelighedskriterier kan gennemsnittet af nedbrydningsprocenterne i kolberne indeholdende teststoffet benyttes til fremstilling af grafen

— procentvis eliminering efter 10-dages-vinduet og ved enten plateau eller testens afslutning.

DEL II. **DOC-ELIMINERING** (Metode C.4-A)

II.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

▼B

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigeret for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

II.2. BESKRIVELSE AF METODEN

II.2.1. **Apparatur**

a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 l, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

c) Filtreringsapparatur med passende membraner

d) DOC-analysator

e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

f) Centrifuge.

II.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

II.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

II.2.4. **Klargøring af kolberne**

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr. liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes inoculum fra aktivt slam eller en anden kilde (se I.6.4) til en slutkoncentration på højst 30 mg opslæmmet tørstof pr. liter. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af. om testkemikaliet har en hæmmende virkning, ved tilsætning af omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe. dvs. en kolbe uden inoculum, til undersøgelse af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6.).

▼B

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler eller lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en flaske indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se bilag II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne. Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet.

II.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: adsorptionskontrol

Kolbe 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

II.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både i 10-dages-vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages-vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendigt til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af vand (I.6.1). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet det påses, at materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se bilag II, punkt 4) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 ^{o}C eller i længere tid ved højst – 18 ^{o}C.

II.3. DATA OG RAPPORTERING

II.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1 (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2 (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

▼B

II.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Se I.5.2.

II.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

II.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

DOC-ELIMINERING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, t_0: … mg/l stof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULSTOFBESTEMMELSER**

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, gnsn. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gnsn. $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inoculumblindprøve uden testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, gnsn.$C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gnsn. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VURDERING AF RÅDATA**

Kolbe nr.		% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Gnsn. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Gennemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. **ABIOTISK KONTROL** (frivillig)

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYSE** (frivillig)

	Restmængde af teststof ved afslutning af test (mg/l)	% primær nedbrydning
Sterilkontrol	S_b	

▼B

	Restmængde af teststof ved afslutning af test (mg/l)	% primær nedbrydning
Inoculerer testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. **MODIFICERET 0ECD-SCREENINGTEST** (Metode C.4-B)

III.1. METODENS PRINCIP

Til en afmålt mængde uorganisk medium indeholdende teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) som den nominelle eneste organisk kulstofkilde, tilsættes der 0,5 ml spildevandsinoculum pr. liter. Blandingen beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigere' for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

III.2. BESKRIVELSE AF METODEN

III.2.1. Apparatur

a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 1, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

c) Filtreringsapparatur med passende membraner

d) DOC-analysator

e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

f) Centrifuge.

III.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

I denne metode anvendes der kun 0,5 ml spildevand pr. liter som.inoculum, og derfor kan det være nødvendigt at tilsætte yderligere sporstoffer og vækstfaktorer til mediet. Dette gøres ved tilsætning af 1 ml af hver af følgende opløsninger pr, liter medium (slutvolumen).

▼B

Opløsning af sporstoffer:

Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4$ 4H,0	39,9 mg
Borsyre, H_3BO_4	57,2 mg
Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4$ $7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Jernchelat ($FeCl_3$ ethylendiamintetraeddikesyre)	100,0 mg

opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

Vitaminopløsning:

Gærekstrakt	15,0 mg

opløses i 100 ml vand. Der steriliseres ved filtrering igennem 0,2 μm membranfilter, hvis opløsningen friskfremstilles hver gang.

III.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inokulum tages fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningsspildevand. Se I.6.4.2 og I.6.5.

0,5 ml pr. liter uorganisk næringsstofopløsning benyttes.

III.2.4. **Klargøring af kolberne**

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr, liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes 0,5 ml spildevand pr. liter (se I.6.4.2.) til kolberne som inoculum. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6).

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler eller lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en kolbe indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se tillæg II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne, Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet,

▼B

III.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: adsorptionskontrol

Kolbe 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

III.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både 10-dages vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages-vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendig til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af fortyndingsvand (I.6.1.). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se bilag II.4.) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 ^{o}C eller i længere tid ved højst – 18 ^{o}C.

III.3. DATA OG RAPPORTERING

III.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1. (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2. (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

III.3.2. Resultaternes gyldighed

Se I.5.2.

III.3.3. Rapportering

Se I.8.

III.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

▼B

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, t_0: … mg/l stof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULSTOFBESTEMMELSER**

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, gnsn. $Ca_{(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gnsn. $Cb_{(t)}$					
Inoculumblindprøve uden testkemikalie	3	C_1					
		C_2					
		C, gnsn. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gnsn. $Cd_{(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VURDERING AF RÅDATA**

Kolbe nr.		% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Kolbe nr.		% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Gnsn. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Gennemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. **ABIOTISK KONTROL** (frivillig)

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYSE** (frivillig)

	Restmængde af teststof ved afslutning af test	% primær nedbrydning
Sterilkontrol	S_b	
Inoculeret testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. CO_2-UDVIKLING (Metode C.4-C)

IV.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-20 mg DOC eller TOC/1) beluftes ved gennemledning af kuldioxidfri luft med kontrolleret hastighed i mørke eller i diffust lys. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved bestemmelse af den dannede mængde kuldioxid, idet den opsamles i barium- eller natriumhydroxid og måles enten ved titrering af det resterende hydroxid eller som uorganisk kulstof. Den mængde kuldioxid, som er udviklet af testkemikaliet (korrigeret for inoculumblindværdien), udtrykkes i procent af $ThCO_2$. Graden af bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende DOC-analyser ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

▼B

IV.2. BESKRIVELSE AF METODEN

IV.2.1. **Apparatur**

a) Kolber, 2-5 l, alle forsynet med beluftningsrør, der næsten når ned til bunden af beholderen, og afgangsåbning

b) Magnetomrørere, når der testes tungtopløselige kemikalier

c) Gasabsorptionsflasker

d) Udstyr til styring og måling af luftgennemstrømning

e) Apparatur til udvaskning af kuldioxid, til fremstilling af kuldioxidfri luft; alternativt kan der benyttes CO_2-fri oxygen og CO_2-fri nitrogen på stålflaske i det rette blandingsforhold (20 % O_2 og 80 % N_2)

f) Udstyr til bestemmelse af kuldioxid, enten titrimetrisk eller ved en eller anden form for analysator for uorganisk kulstof

g) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

h) DOC-analysator (valgfri).

IV.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af sumopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

IV.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

IV .2.4. **Klargøring af kolberne**

Følgende volumen- og vægtangivelser gælder som eksempel for 5-liters kolber med 3 l opslæmning. Anvendes der mindre rumfang, tilpasses værdierne, dog skal den dannede mængde kuldioxid kunne bestemmes nøjagtigt.

Der overføres 2 400 ml uorganisk medium til hver 5-liters kolbe. Der tilsættes så meget klargjort aktivt slam (se I.6.4.1 og I.6.5), at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver højst 30 mg/l i de 3 liter slutblanding. Alternativt kan det klargjorte slam først fortyndes med uorganisk medium til en opslæmning indeholdende 500-1 000 mg/l, hvorefter en del heraf tilsættes til 5-liters kolbens indhold til en koncentration på 30 mg/l; dette giver større nøjagtighed. Der kan benyttes andre inoculumkilder (se I.6.4.2).

Disse blandinger beluftes natten over med CO_2-fri luft, så al kuldioxiden drives ud af systemet.

▼B

Test- og referencestof tilsættes hver for sig som v.h.a. kendte mængder af stamopløsninger til replikakolberne, så der opnås en koncentration på 10-20 mg DOC eller TOC pr. liter; til nogle af kolberne tilsættes der ingen kemikalier, og de fungerer som inoculumkontrolprøver. Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte til kolberne på vægt- eller volumenbasis, eller håndteres som beskrevet i bilag III.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie til samme koncentration som i de andre kolber.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6}. Steriliser ved tilsætning af et giftigt stof i en passende koncentration.

1 alle kolberne fyldes der op til et opslætnningsvolumen på 3 l ved tilsætning af uorganisk medium, der i forvejen er gennemluftet med CO_2-fri luft. Der kan eventuelt udtages prøver til DOC-analyse (se bilag II.4) og/eller specifik analyse. Absorptionsflaskerne forbindes til kolbernes afgangsåbning.

Hvis der anvendes bariumhydroxid, serieforbindes der 3 absorptionsflasker med hver 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidopløsning til hver 5-liters kolbe. Opløsningen skal være fri for bundfald af sulfat og carbonat, og dens styrke skal bestemmes umiddelbart før brugen. Anvendes der natriumhydroxid forbindes der 2 fælder, hvor den sidste fungerer som kontrol af, at al kuldioxiden er absorberet i den første. Absorptionsflasker med serumflaskelukker er egnede. Der anbringes 200 ml 0,05 M natriumhydroxid i hver flaske, hvilket er tilstrækkeligt til at absorbere hele den mængde kuldioxid, der udvikles, når testkemikaliet nedbrydes fuldstændigt. Selv en friskfremstillet natriumhydroxidopløsning vil altid indeholde spor af carbonat; dette korrigeres der for ved subtraktion af blindprøvens carbonatindhold.

IV.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

IV.2.6. **Gennemførelse af testen**

Testen indledes ved gennembobling af opslæmningerne med 30-100 ml CO_2-fri luft pr. minut. Der udtages regelmæssigt prøver af kuldioxidabsorbenten til analyse for CO_2-indhold. Det anbefales, at der i de første 10 dage foretages analyser hver anden eller tredje dag og derefter hver femte dag indtil den 28. dag, således at 10-dagesvinduet kan identificeres.

▼B

På den 28. dag udtages der (eventuelt) prøver til DOC-analyse og/eller specifik analyse, opslæmningernes pH måles, og der tilsættes 1 ml koncentreret saltsyre til hver kolbe; kolberne beluftes natten over, så al kuldioxid drives ud af testopslæmningerne. På den 29. dag foretages den sidste analyse af udviklet kuldioxid.

På de dage, hvor CO_2 bestemmes, fjernes den bariumhydroxidabsorptionsflaske, der er nærmest kolben, og indholdet titreres med 0,05 M HCl med phenolphthalein som indikator. De øvrige absorptionsflasker rykkes én plads nærmere kolben, og der anbringes en ny flaske indeholdende 100 ml friskfremstillet 0,0125 M bariumhydroxyd bagest i serien. Titreringerne foretages efter behov, f.eks. når der er betragteligt bundfald i den første flaske og intet synligt i den anden, dog mindst én gang ugentligt. Anvendes der NaOH som absorptionsmiddel, udtages der med en injektionssprøjte en lille prøve (afhængigt af den anvendte kulstofanalysator) af natriumhydroxidopløsningen i den flaske, der er nærmest ved kolben. Prøven sprøjtes ind i IC-delen af kulstofanalysatoren til direkte analyse af den udviklede kuldioxid.

Indholdet af den anden absorptionsflaske analyseres først ved testens afslutning, så der kan korrigeres for eventuel overførsel af kuldioxid.

IV.3. DATA OG RAPPORTERING

IV.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den absorberede CO_2-mængde er efter titrering givet ved:

$$\text{mg } CO_2 = [(100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A)] \times 44$$

hvor:

V = den mængde HCl, der forbruges til titrering af de 100 ml absorptionsmiddel (ml)

C_B = bariumhydroxidopløsningens koncentration (M)

C_A = saltsyreopløsningens koncentration (M).

Hvis C_B = 0,0125 M og C_A = 0,05 M, skal der anvendes 50 ml til titrering af 100 ml bariumhydroxid, og CO_2-mængden er givet ved:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl til titrering} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

I dette tilfælde skal der altså anvendes en faktor på 1,1 ved omregning fra det rumfang HCl, der medgår til titrering, til det antal mg CO_2, der er udviklet.

Den vægtmængde CO_2, der dannes af inoculum alene og af inoculum plus testkemikalie, beregnes ud fra de pågældende titreringsværdier, og forskellen er den vægtmængde CO_2, som testkemikaliet alene udvikler.

Hvis f.eks. inoculum alene kræver 48 ml til titreringen og inoculum plus testkemikalie kræver 45 ml, fås

CO_2 fra inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 rng

▼B

CO_2 fra inoculum plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

og den vægtmængde CO_2, som testkemikaliet har udviklet, bliver altså 3,3 mg.

Den procentvise bionedbrydning beregnes ved:

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tilsat testkemikalie}}$$

eller

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{\text{mg tilsat TOC i testen} \times 3{,}67}$$

idet 3,67 er omregningsfaktoren (44/12) fra kulstof til kuldioxid.

Den procentvise nedbrydning efter et givet tidsrum beregnes ved summering af de enkelte procentdele af $ThCO_2$, der er målt indtil det pågældende tidspunkt.

Anvendes der natriumhydroxid som absorptionsmiddel, beregnes den udviklede CO_2- mængde, udtrykt som IC (mg), ved multiplikation af absorptionsmidlets IC- koncentration med dets volumen.

Den procentvise nedbrydning beregnes ved:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolbe} - \text{mg IC i blindprøve}}{\text{mg TOC tilsat som testkemikalie}} \times 100$$

Det fjernede DOC beregnes (eventuelt) som beskrevet under I.7. Dette og alle øvrige resultater noteres på de tilhørende skemaer.

IV.3.2. **Resultaternes gyldighed**

IC-indholdet i testkemikalieopslæmningen i uorganisk medium ved testens begyndelse skal være mindre end 5 % af TC, og den udviklede CO_2-mængde i inoculumblindprøven må ved testens afslutning normalt ikke overstige 40 mg pr. liter medium. Hvis der findes værdier på over 70 mg CO_2 pr. liter, gennemgås data og forsøgsteknikker kritisk.

Se også I.5.2.

IV.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

IV.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

KULDIOXIDUDVIKLING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

▼B

Begyndelseskoncentration i mediet: … mg/l stof

Total C tilsat til kolben: … mg C

$ThCO_2$: … $mgCO_2$

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULDIOXIDUDVIKLING OG NEDBRYDELIGHED**

Metode: $Ba(OH)_2$/NaOH/andet

Tid (dage)	udviklet CO_2 test (mg)		udviklet CO_2 blind (mg)		udviklet CO_2 kumuleret (mg) (test minus blindprøve)		% $ThCO_2$ kumuleret $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	gnsn.	3 / 4	gnsn.	1	2	1	2	gnsn.
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Anmærkning: Der kan benyttes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

6. **KULSTOFANALYSE** (valgfri)

Kulstofanalysator:

Tid (dage)	Blindprøve mg/l	Testkemikalie mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) eller ved inkuberingens afslutning.

▼B

$$\% \text{ DOC fjernet} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISK NEDBRYDNING** (valgfri)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{CO_2 - \text{udvikling i steril kolbe efter 28 dage (mg)}}{ThCO_2 (mg)} \times 100$$

DEL V. **MANOMETRISK RESPIROMETRI** (Metode C.4-D)

V.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (100 mg teststof pr. liter svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l) omrøres i en lukket kolbe ved konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i op til 28 dage, Oxygenforbruget bestemmes enten ved måling af den mængde oxygen (fremstillet elektrolytisk), der kræves til opretholdelse af konstant gasvolumen i respirometerkolben, eller ud fra volumen- eller trykændringen (eller en kombination af dem) i apparatet. Udviklet kuldioxid absorberes i en kaliumhydroxidopløsning eller andet egnet absorptionsmiddel. Den oxygenmængde, testkemikaliet har optaget (korrigeret for den parallelle inoculumblindprøves optagelse), udtrykkes som procent af ThOD eller COD. Frivilligt kan primær bionedbrydning også beregnes ved supplerende specifik analyse ved begyndelsen og slutningen af inkuberingen, og fuldstændig bionedbrydning ved analyse af DOC.

V.2. BESKRIVELSE AF METODEN

V.2.1. **Apparatur**

a) Egnet respirometer

b) Temperaturregulering inden for ± 1 °C eller mindre

c) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

d) Kulstofanalysator (valgfri).

V.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2. om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

V.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

V.2.4. **Klargøring af kolberne**

Ud fra stamopløsningerne fremstilles der særskilte opløsninger af test- og referencestof i uorganisk medium med en kemikaliekoncentration på normalt 100 mg/l (svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l).

▼B

ThOD beregnes ud fra dannelsen af ammoniumsalte, medmindre der forventes nitrifikation; i så fald baseres beregningen på nitratdannelsen (se bilag II.2).

pH måles og justeres om nødvendigt til 7,4 ± 0,2.

Tungtopløselige stoffer tilsættes på et senere tidspunkt (se nedenfor).

Hvis teststoffets toksicitet skal bestemmes, fremstilles endnu en opløsning i uorganisk medium, som indeholder både test- og referencestof i samme koncentration som i de enkelte opløsninger.

Hvis bestemmelse af den fysisk-kemiske oxygenoptagelse er påkrævet, fremstilles der en opløsning af teststof i en koncentration på normalt 100 mg ThOD pr. l som er blevet steriliseret ved tilsætningen af et passende giftigt stof (se I.6.6.).

Den nødvendige mængde af henholdsvis test- og referencestofopløsningerne overføres til mindst to kolber (dobbeltbestemmelse). Der klargøres yderligere kolber med uorganisk medium alene (inoculumblindprøver) og hvis nødvendigt med den blandede test- og referencestofopløsning og med den sterile opløsning.

Hvis teststoffet er tungtopløseligt, tilsættes det direkte på dette tidspunkt, enten på vægtbasis eller volumenbasis, eller ved håndtering som beskrevet i bilag III. Der tilsættes kaliumhydroxid, natriumhydroxidperler eller et andet absorptionsmiddel til CO_2-absorbtionskamrene.

V.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

V.2.6. **Gennemførelse af testen**

Beholderne henstår, indtil de har nået den ønskede temperatur, og der tilsættes klargjort aktivt slam eller et andet inoculum til de pågældende beholdere, så der opnås en koncentration af opslæmmet tørstof på højst 30 mg/l. Apparaturet samles, omrøringen sættes i gang, der kontrolleres for lufttæthed, og oxygenoptagelsesmålingen påbegyndes. Normalt kræves der ikke anden pasning end de nødvendige aflæsninger og daglig kontrol af, at temperaturen er korrekt og omrøringen tilstrækkelig.

Oxygenoptagelsen beregnes på grundlag af hyppige regelmæssige aflæsninger, foretaget efter apparaturfabrikantens anvisninger. Ved inkubationsperiodens afslutning, normalt 28 dage, måles pH i kolberne, navnlig hvis oxygenoptagelsen er meget lav eller større end $ThODNH_4$ (for nitrogenholdige forbindelser).

▼B

Om nødvendigt udtages der før og efter inkuberingen prøver fra respirometerkolberne til DOC-analyse eller specifik kemisk analyse (se bilag II.4). Man skal sørge for, at rumfanget af den testopslæmning, der er tilbage i kolben efter den første prøveudtagning, er kendt. Hvis teststoffet er N-holdigt, bestemmes koncentrationsforøgelsen af nitrit og nitrat over 28 dage, og korrektionen for oxygenforbruget ved nitrifikation beregnes (bilag V).

V.3. DATA OG RAPPORTERING

V.3.1. **Behandling af resultaterne**

Testkemikaliets oxygenoptagelse (mg) efter et givet tidsrum (korrigeret for inoculumblindprøvens oxygenoptagelse i samme tidsrum) divideres med vægten af den anvendte teststofmængde. Herved fremkommer BOD udtrvkt i mg oxygen pr. mg testsrof. dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

= mg O_2 pr. mg teststof.

Den procentvise bionedbrydning beregnes enten ved:

$$\%\ \text{bionedbrydning} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2\text{kemikalie})} \times 100,$$

eller

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{COD}(\text{mg } O_2\text{kemikalie})} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode bør foretrækkes.

Der benyttes den ThOD (NH_4 eller NO_3), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Hvis det vælges at foretage bestemmelser af organisk kulstof og/eller af et specifikt kemikalie, beregnes den procentvise nedbrydning som beskrevet under punkt I.7.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

V.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenoptagelse er normalt 20-30 mg O_2/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenoptagelse er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

V.4. **RESULTATSKEMA**

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l

Begyndelseskoncentration i mediet, C_o: … mg/l

Volumen i testkolbe (V): … ml

ThOD eller COD: … mg O_2/mg teststof (NH_4, NO_3)

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof: reaktionsblandingen: … mg/l

5. **OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDELIGHED**

		Tid (dage)											
		0		7		14			21			28	
O_2 opt. (mg) teststof	1												
	2												
	a, gnsn.												
O_2 opt. (mg) blindprøve	3												
	4												
	b, gnsn.												
Korrigeret BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD pr. mg teststof	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tid (dage)											
		0		7		14			21			28	
% nedbrydning edbrydning	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	Gnsn. (*)												

V = volumen af medium i testkolben.
(*) Germemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for reference kemi kaliet og toksicitetskontrolprøveme.

6. **KORREKTION FOR NITRIFIKATION** (se bilag V)

Dag		0	28	forskel
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)			(N)
ii)	Oxygenækvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Nitritconcentration (mg N/l)			(N)
iv)	Oxygenækvivalent (3,43 ×N × V) (mg)	—	—	
ii) + iv)	Total oxygenækvivalent	—	—	

7. **KULSTOFANALYSE** (valgfri)

Kulstofanalysator:

Tid (dage)	Blindprøve mg/l	Testkemikalie mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) eller ved inkuberingens afslutning.

$$\% \text{ DOC fjernet} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTEMMELSE** (valgfri)

S_b = koncentrationen af testkemikalie i steril kontrolkolbe efter 28 dage

S_a = koncentrationen af testkemikalie i kolbe med inoculum efter 28 dage

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYDNING** (valgfri)

a = oxygenforbruget i sterile kolber efter 28 dage (mg)

$$\text{Oxygenforbrug pr. mg teststof} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(se afsnit 1 og 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

DEL VI. **CLOSED BOTTLE TEST** (metode C.4-E)

VI.1. TESTMETODENS PRINCIP

Til en sædvanligvis 2-5 mg/l opløsning af teststoffet i uorganisk medium tilsættes der inoculum bestående af et forholdvis lille antal mikroorganismer fra en blandet population, og opløsningen opbevares i mørke ved konstant temperatur i helt fyldte lukkede kolber. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved analyse af opløst oxygen. Den oxygenmængde, som teststoffet har forbrugt, korrigeres for den oxygenmængde, der er forbrugt i den parallelle inoculumblindprøve, og udtrykkes i procent af ThOD eller COD.

VI.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VI.2.1. **Apparatur**

a) BOD-kolber med glasprop, f.eks. 250-300 ml

b) vandbad eller inkuberingsapparat, som kan holde kolberne ved konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mørke

c) store glasflasker (2-5 l) til fremstilling af medium og opfyldning af BOD-kolberne

d) oxygenelektrode og -måler eller udstyr og reagenser til Winkler-titrering.

VI.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

1 ml af opløsning (a), (b), (c) og (d) fortyndes til 1 liter med vand.

VI.2.3. **Fremstilling af inoculum**

Inoculum tages normalt fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningspildevand. En alternativ inoculumkilde er overfladevand. Brug normalt fra en dråbe (0,05 ml) til 5 ml filtrat pr. liter medium. Afprøvninger kan være nødvendige for at klarlægge det optimale volumen for et givet afløb (se I.6.4.2 og I.6.5).

VI.2.4. **Klargøring af kolberne**

Det uorganiske medium beluftes kraftigt i mindst 20 minutter. En given forsøgsrække udføres med uorganisk medium fra samme batch. Normalt er mediet klar til brug efter henstand i 20 timer ved testtemperaturen. Som kontrol bestemmes koncentrationen af opløst oxygen; værdien skal ligge omkring 9 mg/l ved 20 °C. Al overføring og opfyldning med det luftmættede medium udføres, uden at der dannes bobler, f.eks. med en hævert.

▼B

Der klargøres parallelle grupper af BOD-kolber til samtidige forsøg med test- og referencestof. Der samles så mange BOD-kolber, inklusive inoculumblindprøver, at der mindst kan foretages dobbeltbestemmelse af oxygenforbruget med den ønskede hyppighed, f.eks. efter 0, 7, 14, 21 og 28 dage. Det kan være nødvendigt at anvende flere kolber, hvis man vil være sikker på at kunne identificere 10-dages-vinduet.

De store kolber fyldes en tredjedel op med fuldt beluftet uorganisk medium. Dernæst tilsættes der så meget stamopløsning af test- og referencestof til forskellige kolber, at deres slutkoncentration normalt ikke bliver større end 10 mg/l. Til en særskilt kolbe med kontrolmedium tilsættes der ingen kemikalier.

For at være sikker på, at inoculumaktiviteten ikke begrænses, må koncentrationen af opløst oxygen ikke falde til under 0,5 mg/l i BOD-kolberne, hvilket begrænser testkemikaliets koncentration til ca. 2 mg/l. Af tungt nedbrydelige stoffer og stoffer med lavt ThOD kan der dog anvendes 5-10 mg/l. I visse tilfælde tilrådes det at køre parallelle serier med teststof i to forskellige koncentrationer, f.eks. 2 og 5 mg/l. Normalt beregnes ThOD på basis af dannelsen af ammoniumsalte, men hvis der forventes eller vides at ske nitrifikation, beregnes værdien på grundlag af nitratdannelsen ($ThOD_{NO3}$: se bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation korrigeres der for de ændringer i nitrit- og nitratkoncentrationen, der er bestemt ved analyse (se bilag V).

Endnu en serie kolber er påkrævet, hvis teststoffets toksicitet skal undersøges (f.eks. hvis der tidligere er fundet en lav bionedbrydelighedsværdi).

Hertil klargøres der endnu en stor kolbe med beluftet uorganisk medium (ca. en tredjedel fuld) plus teststof og referencestof normalt i samme slutkoncentrationer som i de andre kolber.

Der tilsættes inoculum til kolberne i form af sekundært afløbsvand (fra 1 dråbe (ca. 0,05 ml) til 5 ml pr. liter) eller f.eks. flodvand (se I.6.4.2). Endelig fyldes der op med beluftet uorganisk medium ved hjælp af en slange, der når helt ned til bunden, så det bliver tilstrækkelig omrøring.

VI.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

I en rypisk testrække anvendes følgende antal kolber:

— mindst 10 med teststof og inoculum (restopslæmning)

— mindst 10 kun med inoculum (inoculumblindprøve)

— mindst 10 med referencestof og inoculum (procedurekontrol)

▼B

— og i givet fald 6 kolber med teststof, referencestof og inoculum (toksicitetskontrol). Til sikker identifikation af 10-dages-vinduet kræves der dog det dobbelte antal kolber.

VI.2.6. Gennemførelse af testen

De fremstillede opløsninger fordeles straks i de pågældende grupper af BOD-kolber, idet de suges op fra den nederste fjerdedel af den passende store kolbe (ikke bunden) med en slange, og således at alle BOD-kolberne fyldes helt. Eventuelle luftbobler fjernes ved en let banken på kolbens side. Starttidskolberne analyseres straks for opløst oxygen enten ved Winklers metode eller med elektrode. Indholdet i kolberne kan opbevares til senere analyse efter Winklers metode, hvis der straks tilsættes mangan(II)sulfat og natriumhydroxid (det første Winkler- reagens). De omhyggeligt tilproppede kolber, hvor oxygenet er fikseret som brunt hydratiseret mangan(III)oxid, opbevares i mørke ved 10-20 ^{o}C i højst 24 timer, inden Winkler-testen gøres færdig. De resterende kolber tiilproppes, idet man sørger for, at der ikke indesluttes nogen luftbobler, og de inkuberes ved 20 ^{o}C i mørke. Parallelt med hver serie skal der være en fuldstændig serie til bestemmelse af inoculumblindværdien. Under de 28 dages inkubering udtages der med bestemte mellemrum (mindst en gang om ugen) mindst 2 kolber af hver serie til analyse for opløst oxygen.

Med ugentlig prøveudtagning skulle den procentvise fjernelse kunne bedømmes i et 14-dages-vindue, mens der ved prøveudtagning hver tredje til fjerde dag, hvilket kræver omtrent det dobbelte antal kolber, bliver mulighed for identificering af 10-dages-vinduet.

For N-holdige stoffers vedkommende må der korrigeres for oxygenforbrug ved eventuel nitrifikation. Hertil anvendes der en O_2-elektrode til bestemmelse af koncentrationen af opløst oxygen, hvorefter der udtages en prøve fra BOD-kolben til analyse for nitrit og nitrat. Den forbrugte oxygenmængde beregnes på grundlag af forøgelsen i nitrit- og nitratkoncentrationen (se bilag V).

V.3. DATA OG RAPPORTERING

VI.3.1. **Behandling af resultaterne**

Først beregnes BOD efter hvert tidsinterval ved at trække oxygentabet (mg O_2 pr. l) i inoculumblindprøven fra oxygentabet i kolben med teststof. Dette korrigerede oxygentab divideres med teststoffets koncentration (mg/l), hvorved den specifikke BOD fremkommer i mg oxygen pr. mg teststof. Den procentvise bionedbrydelighed beregnes ved at dividere den specifikke BOD med den specifikke ThOD (beregnet som anført i bilag II.2) eller COD (bestemt ved analyse, se bilag II.3), dvs.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

▼B

= mg O_2 pr. mg teststof.

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg teststof)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg teststof)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode foretrækkes.

Der benyttes den ThOD (NH_4 eller NO_3), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

VI.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygentab bør ikke være større end 1,5 mg opløst oxygen pr. liter efter 28 dage. Findes der højere værdier, må forsøgsteknikkerne gennemgås kritisk. Restkoncentrationen af oxygen i testkolberne må ikke falde til under 0,5 mg/l på noget tidspunkt. Målinger af så lavt oxygenindhold er kun gyldige, hvis den anvendte målemetode for opløst oxygen tillader nøjagtig måling af så lave indhold.

Se også I.5.2.

VI.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VI.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l

Begyndelseskoncentration i kolbe: … mg/l

ThOD eller COD: … mg O_2/mg teststof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

▼B

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen i reaktionsblandingen: … ml/l

5. **DO-BESTEMMELSE**

Metode: Winkler/elektrode

Kolbeanalyser

Inkuberingstid (dage)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blindprøve (uden teststof)	1	C_1				
	2	C_2				
Gennemsnit	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Teststof	1	a_1				
	2	a_2				
Gennemsnit	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne

6. **KORREKTION FOR NITRIFIKATION** (se bilag V)

Inkuberingstid (dage)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)				
ii)	Ændring i nitratkoncentration (mg N/l)	—			
iii)	Oxygenækvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitritkoncentration (mg N/l)				
v)	Ændring i nitritkoncentration (mg N/l)	—			
vi)	Oxygenækvivalent (mg/l)	—			
iii) + vi)	Total oxygenækvivalent (mg/l)	—			

7. **TAB AF DO: % NEDBRYDNING**

	Tab efter n dage (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Kolbe 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Kolbe 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Tab efter n dage (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Kolbe 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$				
Kolbe 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$				
% D gnsn. (*) $\frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Tag ikke gennemsnittet, hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

m_{to} = værdi i testkolbe til tid 0

m_{tx} = værdi i testkolbe til tid x

m_{bo} = gennemsnitsblindværdi til tid 0

m_{bx} = gennemsnitsblindværdi til tid x

Der foretages desuden korrektion for nitrifikation som beregnet i punkt 6.

8. **BLINDPRØVER FOR TAB AF DO**

Oxygenforbrug i blindprøve: (m_{bo} – m_{b28}) mg/l. Dette forbrug har betydning for testens gyldighed og må højst være 1,5 mg/l.

DEL VII. **MITI-TEST** (Metode C.4-F)

VII.1. METODENS PRINCIP

Oxygenoptagelsen i en omrørt opløsning eller opslæmning af teststoffet i uorganisk medium, som er tilsat inoculum i form af særligt dyrkede ikke-tilvænnede mikroorganismer, måles automatisk gennem en periode på 28 dage i et mørklagt lukket respirometer ved 25 ± 1 °C. Den udviklede kuldioxid absorberes i natriumhydroxid. Bionedbrydeligheden udtrykkes som den optagne oxygenmængde (korrigeret for blindprøvens optagelse) i procent af den teoretiske oxygenoptagelse (ThOD). Også den procentvise primære bionedbrydelighed beregnes, nemlig på grundlag af supplerende specifikke kemiske analyser ved inkuberingens begyndelse og slutning og eventuelt ved DOC-analyse.

VII.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VII.2.1. **Apparatur**

a) Automatisk elektrolytisk BOD-meter eller respirometer, normalt med 6 kolber på hver 300 ml og med skåle til CO_2-absorptionsmiddel

▼B

b) Lokale med konstant temperatur og/eller vandbad på 25 ± 1 °C eller mindre

c) Membranfiltreringsudstyr (valgfrit)

d) Kulstofanalysator (valgfri).

VII.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet og vand (I.6.I):

a)	monokaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikaliummonohydrogenorthophosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatriummonohydrogenorthophosphat dodecahydrat, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	ammoniumchlorid, NH_4Cl	1,70 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	
	Opløsningens pH skal være 7,2.	
b)	magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	
c)	calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$	27,50 g
	Opløses 1 vand og fortyndes til 1 liter.	
d)	jern(III)chlorid hexahydrat, $FcCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	

Der udtages 3 ml af opløsning a), b), c) og d), som fortyndes til 1 liter.

VII.2.3. **Fremstilling af inoculum**

Der indsamles friske prøver fra mindst 10 lokaliteter, hovedsagelig områder, hvor der anvendes og udledes forskellige kemikalier. Fra sådanne lokaliteter som spildevandsanlæg, vandløb, søer og havområder indsamles 1-liters prøver af slam, overfladejord, vand, mv., og det hele blandes grundigt. Materiale, der flyder ovenpå, fjernes, og efter henstand indstilles supernatantens pH til 7 ± 1 med natriumhydroxid og phosphorsyre.

Der benyttes en passende mængde filtrat til at fylde en »fill-and-draw« aktiv slambeholder, og væsken beluftes i ca. 23 1/2 time. 30 minutter efter at beluftningen er standset, borthældes ca. 1/3 af det samlede supernatantvolumen, og der tilsættes en lige så stor mængde af en opløsning (med pH 7), der indeholder 0,1 % glucose, 0,1 % pepton og 0,1 % monokaliumorthophosphat, og beluftningen genoptages. Dette gentages hver dag. Slamenheden drives efter god praksis: Afløbsvandet skal være klart, temperaturen skal holdes på 25 ± 2 °C, pH skal være 7 ± 1, slam skal bundfældes godt, tilstrækkelig beluftning skal opretholdes for at holde blandingen aerob hele tiden, protozoer skal være til stede, og slamaktiviteten skal testes mod referencestoffet mindst hver tredje måned. Slammet må tidligst anvendes som inoculum efter en måneds drift og ikke senere end efter fire måneders drift. Derefter udtages der regelmæssigt prøver fra mindst 10 lokaliteter hver tredje måned.

▼B

For at holde det friske og det gamle slam på samme aktivitet, blandes den filtrerede supernatant fra aktivt slam i brug med en lige så stor mængde filtreret supernatant fra en frisk indsamlet blanding fra 10 kilder, og denne væske opdyrkes som ovenfor nævnt. 18-24 timer efter at enheden er fyldt op, kan der udtages slam til brug som inoculum.

VII.2.4. **Klargøring af kolber**

Der klargøres 6 kolber som følger:

nr. 1: teststof i fortyndingsvand, 100 mg/l

nr. 2, 3 og 4: teststof fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 5: referencestof (f.eks. anilin) fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 6: rent uorganisk medium

Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte på vægt- eller volumenbasis eller håndteres som beskrevet i bilag III, bortset fra, at der hverken må benyttes opløsningsmidler eller emulgatorer. Der anbringes CO_2-absorptionsmiddel i alle kolber i den særlige skål. pH i kolbe nr. 2, 3 og 4 justeres til 7,0.

VII.2.5. **Gennemførelse af testen**

Der tilsættes en lille mængde inoculum til kolbe nr. 2, 3 og 4 (testopslæmninger), nr. 5 (aktivitetskontrol) og nr. 6 (inoculumblindprøve), således at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver på 30 mg/l. Der tilsættes ikke inoculum til kolbe nr. 1, der tjener som abiotisk kontrol. Udstyret samles, der kontrolleres for lufttæthed, omrørerne startes, og oxygenoptagelsesmålingen startes i mørke. Temperaturen, omrøringen og den coulometriske oxygenoptagelsesskriver kontrolleres dagligt, og eventuelle farveændringer i kolberne noteres. Oxygenoptagelsen i de 6 kolber aflæses direkte v.h.a. en passende metode, f.eks. på sekskanalsskriveren, som giver en BOD-kurve. Ved inkuberingens afslutning, normalt efter 28 dage, måles pH i kolberne, og koncentrationen af resterende teststof og af eventuelle mellemprodukter og, når der er tale om vandopløselige stoffer, eventuelt DOC-koncentrationen bestemmes (bilag II.4). Der må udvises særlig omhu, når der er tale om flygtige kemikalier. Forventes der nitrifikation, bestemmes om muligt nitrat- og nitritkoncentrationen.

VII.3. DATA OG RAPPORTERING

VII.3.1. **Behandling af resultaterne**

Teststoffets oxygenfarbrug (mg) efter et givet tidsrum, korrigeret for oxygenoptagelsen i inoculumblindprøven efter samme tidsrum, divideres med den anvendte vægtmængde teststof. Herved fremkommer BOD udtrykt som mg oxygen pr. mg teststof, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2\text{optaget af teststoffet} - \text{mg } O_2\text{optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

= mg O_2 pr. mg teststof.

▼B

Den procentvise bionedbrydning fremkommer af:

$$\%\ \text{bionedbrydning} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}} \times 100$$

For blandinger beregnes ThOD på samme måde som for enkeltstoffer, nemlig på grundlag af grundstofanalysen. Den ThOD, der benyttes, ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) afhænger af, om der slet ikke sker nitrifikation eller der sker fuldstændig nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Den procentvise primære bionedbrydning beregnes ud fra den mængde af det specifikke (oprindelige) kemikalie, der forsvinder (se I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Er der forsvundet teststof i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, anføres dette, og teststoffets koncentration (S_b) i denne kolbe efter 28 dage benyttes til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Foretages der (valgfrie) bestemmelser af DOC, beregnes den procentvise fuldstændige bionedbrydning ved:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

som anført under punkt I.7.1. Er der forsvundet teststof (DOC) i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, benyttes DOC-koncentrationen i denne kolbe til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

VII.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenforbrug er normalt 20-30 mg O_2/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenforbrug er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

Hvis den procentvise nedbrydning af anilin beregnet ud fra oxygenforbrug ikke er større end 40 % efter 7 dage og 65 % efter 14 dage, anses testen for ugyldig.

VII.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VII.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

▼B

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i kolbe, C_o: … mg/l stof

Reaktions blandingens volumen, V: … ml

ThOD eller COD: … mg O_2/l

4. **INOCULUM**

Lokaliteter for prøveudtagning:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Koncentration af opslæmmet tørstof i det aktive slam efter akklimatisering med syntetisk spildevand: … mg/l

Rumfang af aktivt slam pr. liter slutmedium: … ml

Slamkoncentration i slutmedium: mg/l

5. **OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDEL IGHED**

Respirometertype:

			Tid (dage)				
			0	7	14	21	28
O_2 optag, (mg) teststof	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 optag, (mg) blindprøve	b						
Korrigeret O_2 opt. (mg)	$(a_1\text{-}b)$ $(a_2\text{-}b)$ $(a_3\text{-}b)$						
BOD pr. mg teststof	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Kolbe 1					
		Kolbe 2					
		Kolbe 3					
% nedbrydning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		2 3					
		2					
		3					
		gnsn. (*)					

(*) Tag ikke gennemsnittet, hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

▼B

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og oksicitetskontrolprøverne.

6. **KULSTOFANALYSE (valgfri)**

Kulstofanalysator:

Kolbe	DOC				% DOC fjernet	Gennemsnit
	Målt		Korrigeret			
Vand + teststof	a					
Slam + teststof	b_1		b_1-c			
Slam + teststof	b_2		b_2-c			
Slam + teststof	b_3		b_3-c			
Kontrolblind	c		—		—	—

% DOC forsvundet : $\frac{a_1-(b-c)}{a} \times 100$

7. **DATA FRA SPECIFIK KEMISK ANALYSE**

	Restmængde af teststof ved testens afslutning	% nedbrydning
blindprøve med vand	S_b	
medium med inoculum	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrydning beregnes for kolbe a_1, a_2 og a_3.

8. **BEMÆRKNINGER**

En kurve over BOD mod tiden skal vedlægges, hvis den foreligger.

▼B

Bilag I

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

DO: Opløst oxygen (mg/l) er koncentrationen af opløst oxygen i en vandig prøve.

BOD: Biokemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, som mikroorganismer forbruger under metabolisme af teststoffet; udtrykkes også i g optaget oxygen pr. g teststof (se metode C.6).

COD: Kemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, der forbruges ved oxidation af teststoffet med varm dichromat i sur væske; det er et mål for den tilstedeværende mængde oxiderbart stof; udtrykkes også i g forbrugt oxygen pr. g teststof (se metode C.6).

DOC: Opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 μm filter, eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 40 000 ms^{-2}± (4 000 g) i 15 minutter.

ThOD: Teoretisk oxygenforbrug (mg) er den samlede mængde oxygen, der kræves til fuldstændig oxidation af et kemisk stof; det beregnes på grundlag af bruttoformlen (se bilag II, punkt 2) og udtrykkes også i mg oxygen pr. mg teststof.

$ThCO_2$: Teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af teststoffets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af teststoffet; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg teststof.

TOC: En prøves totale indhold af organisk kulstof er summen af organisk kulstof i opløsning og i opslæmning.

IC: Uorganisk kulstof

TC: En prøves totale kulstofindhold er summen af organisk og uorganisk kulstof.

Primær bionedbrydning:

er en sådan ændring af et stofs kemiske struktur, fremkaldt ad biologisk vej, at stoffet mister sine specifikke egenskaber.

Fuldstændig bionedbrydning (aerob):

er den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et teststof fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, uorganiske salte og nye cellebestanddele (biomasse).

Let bionedbrydelig:

kendetegner en arbitrær klasse af kemikalier, der har klaret visse specifikke screeningstest for fuldstændig bionedbrydning; disse test er så krævende, at sådanne stoffer i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

▼B

Inherent (potentielt) bionedbrydelig:

karakteriserer en klasse af kemikalier, som ved enhver anerkendt bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

Behandlingsmulighed:

er muligheden for at fjerne et stof ved biologisk spildevandsrensning uden at spildevandsrensningsprocessernes normale forløb forstyrres. Generelt er alle let bionedbrydelige, men ikke alle inherent bionedbrydelige, stoffer mulige at behandle. Abiotiske processer kan også spille ind.

Lag-periode:

er det tidsrum, der i en elimineringstest forløber fra inokuleringen, indtil nedbrydningsprocenten er mindst 10 %. Lag-perioden er ofte stærkt varierende og vanskeligt reproducerbar.

Nedbrydnings tid:

er tidsrummet mellem lagperiodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

10-dages-vindue:

er den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

▼B

Bilag II

BEREGNING OG BESTEMMELSE AF PASSENDE HOVEDPARAMETRE

Der vil afhængigt af den valgte metode være behov for forskellige hovedparametre. I dette afsnit beskrives, hvordan disse værdier udledes. Parametrenes anvendelse er beskrevet i de enkelte metoder.

1. **Kulstofindhold**

Kulstofindholdet kan enten beregnes ud fra teststoffets grundstofsammensætning elier bestemmes ved elementaranalyse.

2. **Teoretisk oxygenforbrug (ThOD)**

Det teoretiske oxygenforbrug (ThOD) kan beregnes, hvis grundstofsammensætningen er kendt, og ellers bestemmes ved elementaranalyse. For forbindelsen:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

er det uden nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ (2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o)}{MW}\ mg/mg$$

og med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ (2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o)}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemisk oxygenforbrug (COD)**

Det kemiske oxygenforbrug (COD) bestemmes efter metode C.6.

4. **Opløst organisk kulstof (DOC)**

Opløst organisk kulstof (DOC) defineres som den organiske kulstofmængde i et kemikalie eller en kemikalie-blanding, som i vandig opløsning kan passere gennem et 0,45 μm filter.

Der udtages prøver fra testbeholderne, som straks filtreres gennem filtreringsudstyret, der er forsynet med et passende membranfilter. De første 20 ml af filtratet bortkastes (ved små filtre kan denne mængde reduceres). Der opsamles en mængde på 10-20 ml til kulstofanalyse (ved indsprøjtning mindre, afhængigt af den anvendte kulstofanalysator). DOC-koncentrationen bestemmes ved hjælp af en organisk kulstofanalysator, som tillader nøjagtig bestemmelse af en kulstofkoncentration på mindre end 10 % af startkoncentrationen af DOC i testen.

Kan filtrerede prøver ikke analyseres samme arbejdsdag, kan de opbevares i højst 48 timer i køleskab ved 2-4 °C eller i længere tid ved – 18 °C.

Anmærkninger:

Membranfiltre er ofte behandlet med overfladeaktive stoffer, så de bliver mere hydrofile. De kan derfor indeholde op til flere mg opløseligt organisk kulstof, som vil gribe forstyrrende ind i bionedbrydehghedsbestemmelsen. De overfladeaktive stoffer og andre opløselige organiske stoffer fjernes fra filtrene ved kogning i demineraliseret vand i 3 gange 1 time. Derefter kan filtrene opbevares i vand i op til 1 uge. Benyttes der engangsfiltre, må hvert parti kontrolleres for afgivelse af opløseligt organisk kulstof.

▼B

På visse typer membranfiltre kan der ske adsorption af teststoffet. Det tilrådes derfor at kontrollere, at teststoffet ikke tilbageholdes på filteret.

Centrifugering ved 40 000 ms^{-2} (4 000 g) i 15 minutter kan træde i stedet for filtrering, når der skal skelnes mellem TOC og DOC. Metoden er ikke pålidelig ved en startkoncentration på < 10 mg DOC pr. l, da enten ikke alle bakterier fjernes eller noget af kulstoffet i bakteriernes cytoplasma genopløses.

BIBLIOGRAFI

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Bilag III

VURDERING AF TUNGTOPLØSELIGE STOFFERS BIONEDBRYDELIGHED

Nedenstående forhold kræver særlig opmærksomhed ved test af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

Homogene væsker vil sjældent volde problemer ved prøveudtagningen, hvorimod det anbefales at homogenisere faste materialer på passende måde, således at fejl som følge af inhomogenitet undgås. Der må udvises særlig omhu, når der skal udtages en repræsentativ prøve på nogle få mg af blandinger af kemikalier og af stoffer, der indeholder store mængder urenheder.

Under testen kan der anvendes forskellige former for omrøring. Omrøringen skal blot være så kraftig, at kemikaliet holdes dispergeret, og overophedning, stærk skumning og voldsomme forskydningskræfter skal undgås.

Der kan benyttes en emulgator tii at frembringe en stabil dispersion af kemikaliet. Emulgatoren må ikke være toksisk for bakterier og må hverken kunne bionedbrydes eller vare skumdannende under testbetingelserne.

Der gælder samme kriterier for opløsningsmidler som for emulgatorer.

Det frarådes at benytte faste bærematerialer til faste teststoffer, hvorimod de kan være egnede til olieagtige stoffer.

Når der anvendes hjælpestoffer såsom emulgatorer, opløsningsmidler og bærematerialer, udføres der en blindprøve med hjælpestoffet.

Alle tre respirometertest, CO_2, BOD og MITI, kan benyttes til undersøgelse af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

BIBLIOGRAFI

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Bilag IV

VURDERING AF BIONEDBRYDELIGHEDEN AF KEMISKE STOFFER, DER MISTÆNKES FOR AT VÆRE TOKSISKE FOR INOCULUM

Hvis et kemisk stof, som underkastes en test for let bionedbrydelighed, ikke synes at være bionedbrydeligt, tilrådes det at følge nedenstående fremgangsmåde, hvis der ønskes skelnet mellem hæmning og manglende nedbrydelighed (Reynolds et al., 1987).

Der anvendes samme eller tilsvarende inoculum til toksicitetstest som til bionedbrydningstest.

For at kunne vurdere toksiciteten af kemikalier, der undersøges i test for let bionedbrydelighed, kan man anvende en af følgende metoder eller en kombination af dem: Hæmning af slammets respirationshastighed (aktiveret slam — respirationshæmningstest — direktiv 88/302/EØF); BOD og/eller vækshæmningstest.

Hvis hæmning som følge af toksicitet skal undgås, anbefales det at benytte teststofkoncentrationer i test for let bionedbrydelighed, som er højst 1/10 af de EC_{50}-værdier (eller højst de EC_{20}-værdicr), der er fundet ved toksicitetstest. Stoffer, hvis EC_{50} er sterre end 300 mg/l, vil næppe have toksiske virkninger i test for let bionedbrydelighed.

En EC_{50} på mindre end 20 mg/l vil sandsynligvis skabe betydelige vanskeligheder for den efterfølgende testning. Testkoncentrationerne skal være lave, hvilket kræver anvendelse af den strenge og følsomme Closed Bottle-test eller af ^{14}C-mærket materiale. Alternativt kan der ved tilvænning af inoculum blive mulighed for at benytte højere teststofkoncentrationer. I sidstnævnte tilfælde mister testen for let bionedbrydelighed dog sin specifikke karakter.

BIBLIOGRAFI

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Bilag V

KORREKTION AF NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ OXYGENOPTAGELSEN

Fejl ved at undlade at tage hensyn til nitrifikation ved vurdering af bionedbrydeligheden af teststoffer, der ikke indeholder N, er minimal (højst 5 %), selv om oxidationen af mediets indhold af ammonium-N svinger vilkårligt fra testprøve til blindprøve. For teststoffer, der indeholder N, kan der imidlertid opstå væsentlige fejl.

Hvis der sker ufuldstændig nitrifikation, kan reaktionsblandingens iagttagne oxygenoptagelse korrigeres for den oxygenmængde, der er medgået til oxidation af ammonium til nitrit og nitrat, hvis ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen under inkuberingen bestemmes under hensyntagen til følgende reaktionsligninger:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Ud fra ligning (1) bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen i form af ammoniumchlorid (NH_4Cl) til nitrit 96 g, dvs. en faktor på 3,43 (96/28). På tilsvarende måde bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen til nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor på 4,57 (128/28).

Da reaktionerne er sekventielle, idet de finder sted p.g.a. hver deres bakteriearter, kan nitritkoncentrationen stige eller falde; i sidstnævnte tilfælde vil der blive dannet en ækvivalent mængde nitrat. Derfor bliver oxygenforbruget ved nitratdannelsen 4,57 gange forøgelsen i nitratkoncentrationen, hvorimod den oxygenmængde, der er involveret i nitritdannelsen, er 3,43 gange forøgelsen i nitritkoncentrationen, eller ved et fald i nitritkoncentrationen, et oxygentab på — 3,43 gange koncentrationsfaldet.

Det vil sige, at

O_2-forbrug ved nitratdannelse = 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (4)

og

O_2-forbrug ved nitritdannelse = 3,43 × N-nitritkoncentrationsforøgelsen (5)

og

O_2-tab ved nitritomdannelse = – 3,43 × N-nitratkoncentrationsfaldet (6)

Derved bliver

O_2-forbrug til nitrifikation = ± 3,43 × N-nitritkoncentrationsændringen + 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (7)

og dermed

O_2-forbrug til C-oxidation = samlet iagttaget forbrug — forbrug til nitrifikation (8).

Alternativt kan oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation som en første tilnærmelse sættes til 4,57 × tilvæksten i oxideret N, hvis kun total oxyderet N bestemmes.

Den korrigerede værdi for oxygenforbruget til C-oxidation sammenlignes dernæst med $ThOD_{NH4}$ beregnet efter bilag II.

▼B

C.5. **NEDBRYDNING — BIOKEMISK OXYGENFORBRUG**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med metoden er måling af det biokemiske oxygenforbrug (BOD) for faste eller flydende organiske stoffer.

Data, som opnås med denne test, vedrører vandopløselige stoffer; dog kan, i det mindste i princippet, flygtige stoffer samt stoffer med lav vandopløselighed også testes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske testmaterialer, der ikke virker hæmmende for bakterier ved den koncentration, som anvendes ved testen. Hvis testmaterialet ikke lader sig opløse ved testkoncentrationen, kan det være nødvendigt at anvende særlige foranstaltninger, såsom ultralyddispersion for at opnå god dispersion af testmaterialet.

Oplysninger om kemikaliets toksicitet kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

BOD defineres som den mængde opløst oxygen, der kræves til biokemisk oxidation af en nærmere angivet mængde opløsning af stoffet under foreskrevne betingelser.

Resultatet udtrykkes som g BOD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Brug af et egnet referencestof til kontrol af inoculums aktivitet er ønskelig.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde stof, opløst eller dispergeret i et egnet og godt gennemluftet medium, podes med mikroorganismer og inkuberes ved konstant kendt temperatur i mørke.

BOD bestemmes som forskellen mellem indholdet af opløst oxygen ved forsøgets begyndelse og ved forsøgets afslutning. Forsøgets varighed skal være mindst fem dage og ikke over 28 dage.

Der udføres parallelt en blindprøve uden indhold af reststof.

1.5. KVALITETSKRITERIER

En BOD-bestemmelse kan ikke betragtes som en gyldig bestemmelse af et stofs bionedbrydelighed, men kun som en screeningtest.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

En foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet fremstilles for at opnå en BOD-koncentration, som er forenelig med den anvendte metode. BOD bestemmes derpå efter en hvilken som helst egnet national eller international standardmetode.

▼B

2. **DATA OG EVALUERING**

BOD-indholdet i opløsningen beregnes efter den valgte standardmetode og omregnes til g BOD pr. g stof.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte metode skal anføres.

Det biokemiske oxygenforbrug skal være gennemsnittet af mindst tre gyldige målinger.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder, fysiske tilstand og toksiske virkninger, som vil kunne påvirke resultaterne.

Eventuel brug af tilsætningsstof til at hindre biologisk nitrifikation skal rapporteres.

4. HENVISNINGER

Liste over standardiserede metoder, f.eks.

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **NEDBRYDNING — KEMISK OXYGENFORBRUG**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at måle det kemiske oxygenforbrug (COD) for faste og flydende organiske stoffer på en vilkårlig standardiseret måde under bestemte laboratoriebetingelser.

Oplysninger om stoffets formel vil være nyttige ved gennemførelse af testen og for fortolkningen af de opnåede resultater (f.eks. halogensalte, organiske jern(II)salte, organiske chlorforbindelser).

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Det kemiske oxygenforbrug er et mål for et stofs evne til at kunne oxideres, og det udtrykkes som den ækvivalente mængde oxygen i det oxiderende reagens, der forbruges af stoffet under bestemte laboratoriebetingelser.

Resultatet udtrykkes som g COD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kalibrering af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde af stoffet, opløst eller dispergeret i vand, oxideres med kaliumdichromat i stærkt svovlsur opløsning med sølvsulfat som katalysator under tilbagesvaling i to timer. Den uforbrugte mængde dichromat bestemmes ved titrering med en standardopløsning af ferroammoniumsulfat.

I tilfælde af chlorholdige stoffer tilsættes mercurisulfat ([1]) for at nedsætte interferens fra chlorid.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Da metoden har en vis vilkårlig karakter, må COD betragtes som en »oxiderbarhedsindikator«, der er et praktisk mål for indholdet af organisk stof.

Chlorid kan forstyrre målingen; også uorganiske reducerende eller oxiderende stoffer kan forstyrre COD-bestemmelsen.

Visse cykliske forbindelser og mange flygtige stoffer (f.eks. lavere fedtsyrer) oxideres ikke fuldstændigt ved denne metode.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der fremstilles en foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet, således at der opnås en COD-værdi mellem 250 og 600 mg pr. liter.

([1]) Brugte opløsninger, der indeholder mercurisalte, behandles således, at der ikke spredes kviksølv: i miljøet.

▼B

Bemærkning:

I tilfælde af vanskeligt opløselige og ikke dispergerbare stoffer kan der afvejes en mængde fint pulveriseret eller væskeformigt stof svarende til ca. 5 mg COD, som overføres til forsøgsopstillingen med vand.

Det kemiske oxygenforbrug kan ofte, og især for stoffer med ringe opløselighed, med fordel bestemmes med en variant af metoden, nemlig et lukket system med trykudligning (H. Kelkenberg, 1975). Med denne modifikation kan der ofte med held foretages kvantitativ bestemmelse af forbindelser, der kun vanskeligt kan bestemmes ved konventionelle metoder, f.eks. eddikesyre. Metoden duer dog ikke til pyridin. Forøgelse af kaliumdichromatkoncentrationen til 0,25 N (0,0416 M) som anført i henvisning (1) kan lette den direkte afvejning af 5-10 mg stof, hvilket er en betingelse for COD-bestemmelse på stoffer med ringe vandopløselighed (henvisning (2)).

I øvrigt bestemmes COD derefter ved hjælp af en egnet national eller international standardmetode.

2. **DATA OG EVALUERING**

COD-indholdet i forsøgskolben beregnes i henhold til den valgte standardmetode og omregnes til g COD pr. g teststof.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte referencemetode skal anføres.

Det kemiske oxygenforbrug skal være et gennemsnit af mindst tre målinger. Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder og fysiske tilstand (hvis de kendes), som vil kunne påvirke resultaterne.

Anvendelse af mercurisulfat til formindskelse af interferens fra chlorid skal rapporteres.

4. **HENVISNINGER**

(1) Kelkenberg, H. Z, von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Liste over standardiserede metoder, f.eks.:

NBN T 91-201: Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis: Determination of the chemical oxygen: demand.

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. NEDBRYDNING — ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH

1. METODE

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 111 (2004).

1.1. INDLEDNING

Kemiske stoffer kan tilføres overfladevande ved direkte udledning, vinddrift, afstrømning, afvanding, affaldsbortskaffelse, udledning fra industri, husholdninger eller landbrug samt ved afsætning fra atmosfæren og kan i sådanne vande omdannes ved kemiske (f.eks. hydrolyse, oxidation), fotokemiske og/eller mikrobielle processer. I denne vejledning beskrives en laboratoriemetode til vurdering af abiotisk hydrolytisk omdannelse af kemiske stoffer i akvatiske systemer ved de i miljøet normalt forekommende pH-værdier (pH 4-9), baseret på eksisterende guidelines (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Formålet med forsøgene er at bestemme i) hydrolysehastigheden af prøvestoffet som funktion af pH og ii) identitet eller art af samt dannelses- og nedbrydningshastighed for hydrolyseprodukter, som organismer kan blive udsat for. Sådanne undersøgelser kan være påkrævede for kemiske stoffer, der direkte tilføres vand eller må forventes at nå miljøet ad de andre veje beskrevet ovenfor.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Se bilag 2.

1.3. METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden finder anvendelse på alle kemiske stoffer (umærkede eller mærkede), for hvilke der foreligger en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Den finder anvendelse på tungtflygtige og ikke-flygtige forbindelser med tilstrækkelig vandopløselighed. Metoden bør ikke anvendes på stoffer, der er letflygtige fra vand (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke kan holdes i opløsning under de her beskrevne forsøgsbetingelser. Den kan være vanskelig at anvende på stoffer med meget ringe vandopløselighed (8).

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Sterile vandige bufferopløsninger med forskellige pH-værdier (pH 4, 7 og 9) behandles med prøvestoffet og inkuberes i mørke under kontrollerede laboratoriebetingelser (ved konstant temperatur). Efter passende tidsintervaller analyseres bufferopløsningerne for prøvestoffet og for hydrolyseprodukter. Anvendelse af mærket prøvestof (f.eks. ^{14}C) letter opstilling af en massebalance.

I metoden anvendes en trinvis fremgangsmåde som illustreret og forklaret i bilag 1. Hvert trin udløses af resultaterne af det foregående trin.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af hydrolysehastighed kan anvendes umærket eller mærket prøvestof. Til undersøgelse af hydrolysevejen og opstilling af massebalance er mærket stof sædvanligvis at foretrække; i særlige tilfælde er mærkning dog ikke absolut nødvendig. ^{14}C-mærkning anbefales, men andre isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N eller ^{3}H, kan ligeledes være nyttige. Mærket bør så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e). Indeholder prøvestoffet således én ring, skal denne ring være mærket; indeholder stoffet to eller flere ringe, kan det være nødvendigt med separate undersøgelser til fastlæggelse af skæbnen af hver mærket ring og til at skaffe tilstrækkelige oplysninger om dannelsen af hydrolyseprodukter. Prøvestoffets renhed skal være mindst 95 %.

Før udførelse af et hydrolyseforsøg bør følgende oplysninger om prøvestoffet foreligge:

a) vandopløselighed (testmetode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (testmetode A.4) og/eller Henrys lovkonstant

d) fordelingskoefficient n-oktanol/vand (testmetode A.8)

e) dissociationskonstant (pK_a) (OECD Guideline 112) (9)

f) når det er hensigtsmæssigt, direkte og indirekte fototransformationshastighed i vand.

Der bør foreligge analysemetoder til kvantitativ bestemmelse afprøvestoffet og, hvis relevant, identifikation og kvantitativ bestemmelse af hydrolyseprodukter i vandige opløsninger (se også punkt 1.7.2).

1.6. REFERENCESTOFFER

Når det er muligt, bør der anvendes referencestoffer til identifikation og kvantitativ bestemmelse af hydrolyseprodukter ved spektroskopiske og kromatografiske metoder eller andre metoder med tilstrækkelig følsomhed.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfinding**

Analyse af mindst dobbelte bufferopløsninger eller af ekstrakter deraf efter tilsætning af prøvestoffet giver et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om ensartetheden af tilsætningen af prøvestoffet. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer (når mærket stof anvendes). Genfindingen bør være mellem 90 % og 110 % for mærkede og umærkede kemiske stoffer (7). Hvis det er teknisk vanskeligt at nå dette område, er en genfindingsgrad på 70 % for umærkede kemiske stoffer acceptabel, men skal begrundes.

▼B

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af de(n) analysemetode(r), der senere anvendes til kvantificering af prøvestoffet og hydrolyseprodukter, kan kontrolleres ved dobbeltanalyse af de samme bufferopløsninger (eller af ekstrakter deraf), efter at der er dannet en tilstrækkelig mængde hydrolyseprodukter til kvantitativ bestemmelse.

Analysemetoden skal være tilstrækkelig følsom til at kvantificere prøvestofkoncentrationer ned til 10 % eller derunder af begyndelseskoncentrationen. Hvis det er relevant, skal analysemetoderne desuden være tilstrækkelig følsomme til kvantificering af eventuelle hydrolyseprodukter, der udgør 10 % eller mere af den tilsatte mængde (til et vilkårligt tidspunkt under undersøgelsen) ned til 25 % eller derunder af deres spidskoncentration.

1.7.3. **Konfidensintervaller for hydrolysekinetikdata**

Der beregnes og angives konfidensintervaller for alle regressionskoefficienter, hastighedskonstanter, halveringstider og eventuelle andre kinetikparametre (f.eks. DT_{50}).

1.8. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.8.1. **Udstyr og apparatur**

Undersøgelsen udføres i glasbeholdere (f.eks. reagensglas eller små kolber), om nødvendigt i mørke og under sterile betingelser, medmindre foreløbige oplysninger (som f.eks. n-oktanol-vand fordelingskoefficienten) viser, at prøvestoffet kan adhærere til glas. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at overveje alternative materialer (som f.eks. Teflon). Problemet med adhæsion til glas kan desuden løses ved en eller flere af følgende metoder:

— bestemmelse af den masse prøvestof og hydrolyseprodukter, der er sorberet til prøvebeholderen

— anvendelse af ultralydsbad

— vask af alt glasapparatur i opløsningsmiddel ved hvert prøvetagningsinterval

— anvendelse af færdigformuleret produkt

— anvendelse af ekstra hjælpefortynder ved tilsætning af prøvestof til systemet; som hjælpefortynder må undgås stoffer der hydrolyserer prøvestoffet.

Til inkubering af de forskellige prøveopløsninger skal normalt anvendes temperaturstyrede vandbade eller termostaterede inkubatorer.

Sædvanligt laboratorieudstyr skal være til rådighed, herunder specielt følgende:

— pH-meter

▼B

— analyseapparatur som f.eks. GC, HPLC og TLC med passende detektionssystem til analyse af radioaktivt mærkede eller umærkede stoffer eller til omvendt isotopfortyndingsmetode

— instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, mv.)

— væskescintillationstæller

— skilletragte til væske-væske ekstraktion

— udstyr til koncentrering af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper)

— temperaturreguleringsanordning (f.eks. vandbad).

Kemiske reagenser, f.eks. følgende:

— organiske opløsningsmidler af analysekvalitet, således hexan, dichlormethan mv.

— scintillationsvæske

— bufferopløsninger (som nærmere angivet i pkt. 1.8.3).

Alt glasudstyr, vand af analysekvalitet og bufferopløsninger, som anvendes i hydrolyseforsøgene, skal være steriliseret.

1.8.2. **Tilsætning af prøvestoffet**

Prøvestoffet tilsættes som vandig opløsning til de forskellige bufferopløsninger (se bilag 3). Om nødvendigt kan man for at få opløst tilstrækkeligt af stoffet tilsætte lidt vandopløseligt opløsningsmiddel (f.eks. acetonitril, acetone, ethanol) når prøvestoffet tilsættes og fordeles, men normalt ikke i større mængde end 1 % v/v. Anvendelse af opløsningsmidler i højere koncentration (f.eks. til tungtopløselige prøvestoffer) er kun tilladt, hvis det godtgøres at opløsningsmidlet er uden indflydelse på hydrolysen afprøvestoffet.

Rutinemæssig brug af formuleret produkt kan ikke anbefales, da det ikke kan udelukkes at hjælpestoffer i formuleringen vil påvirke hydrolyseprocessen. For prøvestoffer der er tungtopløselige i vand, og for stoffer der adhærerer til glas (se 1.8.1) kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

Prøvestoffet bør anvendes i én koncentration, der ikke bør være over 0,01 M eller det halve af mætningskoncentrationen (se bilag 1).

▼B

1.8.3. **Bufferopløsninger**

Hydrolyseforsøget udføres ved pH 4, 7 og 9. Vand og kemikalier anvendt til fremstilling af sådanne bufferopløsninger skal være af analysekvalitet. I bilag 3 beskrives nogle nyttige buffersystemer. Man må være opmærksom på, at det anvendte buffersystem kan influere på hydrolysehastigheden, og er dette tilfældet, må der vælges et andet buffersystem ([1]).

pH af hver bufferopløsning skal kontrolleres med et kalibreret pH-meter med en nøjagtighed på mindst 0,1 ved den foreskrevne temperatur.

1.8.4. **Forsøgsbetingelser**

1.8.4.1. *Forsøgstemperatur*

Hydrolyseforsøgene skal udføres ved konstant temperatur. Til brug ved ekstrapolation er det vigtigt, at temperaturen holdes konstant inden for ± 0,5 °C.

Der bør udføres et indledende forsøg (trin 1) ved en temperatur på 50 °C, hvis prøvestoffets hydrolyseegenskaber er ukendte. Kinetiske forsøg på efterfølgende trin udføres ved mindst tre temperaturer (herunder forsøget ved 50 °C), medmindre prøvestoffet ved trin 1-forsøget er fundet stabilt over for hydrolyse. Det foreslås at anvende et temperaturområde på 10-70 °C (idet mindst én temperatur bør være under 25 °C), der således dækker rapporteringstemperaturen på 25 °C og størstedelen af det temperaturområde, der forekommer i marken.

1.8.4.2. *Lys og oxygen*

Alle hydrolyseforsøg skal udføres med en metode, der bevirker at fotolytiske effekter undgås. Der skal træffes alle nødvendige forholdsregler til undgåelse af oxygen (f.eks. ved gennembobling med helium, nitrogen eller argon i 5 minutter, før opløsningen fremstilles).

1.8.4.3. *Forsøgets varighed*

Forprøven strækker sig over 5 døgn, hvorimod de efterfølgende forsøg fortsætter indtil prøvestoffet er 90 % hydrolyseret, dog højst 30 døgn.

1.8.5. **Forsøgets udførelse**

1.8.5.1. *Forprøve (trin 1)*

Forprøven udføres ved 50 ± 0,5 °C og pH 4,0, 7,0 og 9,0. Iagttages mindre end 10 % hydrolyse efter 5 døgn ($t_{0,5}$25 °C > 1 år), anses prøvestoffet for hydrolytisk stabilt, og yderligere forsøg kræves normalt ikke. Vides stoffet at være ustabilt ved miljømæssigt relevante temperaturer ([2]), er forprøve unødvendig. Analysemetoden skal være tilstrækkelig præcis og følsom til at påvise en reduktion på 10 % af begyndelseskoncentrationen.

([1]) Mabey og Mill anbefaler brug af borat- eller acetatbuffer i stedet for fosfat (11).

([2]) Sådanne oplysninger kan komme fra andre kilder, således hydrolysedata for strukturelt beslægtede forbindelser, fra litteraturen eller fra andre semikvantitative forprøver med hydrolyse af prøvestoffet i en tidligere udviklingsfase.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse af ustabile stoffer (trin 2)*

Forsøget på næste trin (avanceret) udføres ved de pH-værdier, hvor prøvestoffet i ovennævnte forprøve er fundet ustabilt. De bufrede opløsninger af prøvestof termostateres ved de valgte temperaturer. Med henblik på fastlæggelse af førsteordens-kinetik analyseres hver reaktionsopløsning med tidsintervaller svarende til mindst seks adskilte datapunkter, normalt svarende til mellem 10 % og 90 % hydrolyse af prøvestoffet. De enkelte gentagelsesprøver (mindst dobbeltprøver, der opbevares i separate reaktionsbeholdere) udtages, og indholdet analyseres på hvert af mindst seks prøvetagningstidspunkter (svarende til mindst tolv datapunkter med gentagelser). Det anses for uhensigtsmæssigt at anvende en enkelt bulkprøve og heraf udtage de enkelte aliquoter af prøveopløsningen på hvert prøvetagningstidspunkt, da der derved ikke tages hensyn til analysevariationen, og da kontamination af prøveopløsningen kan være et problem. Sterilitetskontrol udføres ved afslutningen af det efterfølgende trin (dvs. ved 90 % hydrolyse eller efter 30 døgn). Iagttages ingen nedbrydning (dvs. omdannelse), anses sterilitskontrol dog for unødvendig.

1.8.5.3. *Identifikation af hydrolyseprodukter (trin 3)*

De vigtigste hydrolyseprodukter, i det mindste dem, der udgør > 10 % af den tilførte dosis, identificeres med egnede analysemetoder.

1.8.5.4. *Ikke-obligatoriske forsøg*

For hydrolytisk ustabile prøvestoffer kan supplerende forsøg ved andre pH-værdier end 4, 7 og 9 være nødvendige. Det kan således være nødvendigt at foretage et forsøg ved større surhedsgrad (f.eks. pH 1,2) ved en enkelt fysiologisk relevant temperatur (37 ^{o}C).

2. **DATA**

Mængden af prøvestof og af eventuelle hydrolyseprodukter angives i % af den anvendte begyndelseskoncentration og, når det er hensigtsmæssigt, i mg/l for hvert prøvetagningsinterval og for hver pH-værdi og forsøgstemperatur. Anvendes mærket prøvestof, skal der desuden opstilles en massebalance, angivet i procent af den anvendte begyndelseskoncentration.

De logaritmisk transformerede prøvestofkoncentrationsdata afbildes grafisk som funktion af tiden. Alle vigtige hydrolyseprodukter, i det mindste dem der udgør ≥ 10 % af den anvendte dosis, identificeres, og deres logaritmisk transformerede koncentration afsættes som for moderstoffet til påvisning af deres dannelses- og nedbrydningshastighed.

▼B

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Der skal foretages en nøjagtigere bestemmelse af halveringstider eller DT_{50}-værdier ved passende kinetiske modelberegninger. For hvert pH og hver temperatur angives halveringstid og/eller DT_{50} (med konfidensinterval) sammen med en beskrivelse af den anvendte model, den kinetiske orden og determinationskoefficienten (r^2). Samme beregninger foretages desuden for hydrolyseprodukterne, når det er relevant.

For kinetikforsøg udført ved forskellige temperaturer angives hastighedskonstanterne for hydrolysen svarende til en pseudoførsteordensreaktion (k_{obs}) som funktion af temperaturen. Beregningen baseres på opdeling af k_{obs} i hastighedskonstanter for syrekatalyseret, neutral og basekatalyseret hydrolyse (hhv. k_H, $k_{neutral}$ og k_{Oh}) og på Arrhenius-ligningen:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

hvor A_i og B_i er regressionskonstanterne beregnet af hhv. akseafskæring og hældning af de bedst tilnærmede linjer, der genereres ved lineær regression af ln k_i mod den reciprokke absolutte temperatur i kelvin (T). Ved at anvende Arrhenius-relationen på sur, neutral og basekatalyseret hydrolyse kan pseudoførsteordens hastighedskonstanter og dermed halveringstider beregnes for andre temperaturer, for hvilke det ikke er praktisk muligt at bestemme hastighedskonstanten direkte eksperimentelt (10).

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

De fleste hydrolysereaktioner følger en tilsyneladende førsteordens kinetik, hvorfor halveringstiden er koncentrationsuafhængig (jf. ligning 4 i bilag 2). Derfor kan laboratorieresultater opnået i området 10^{-2} til 10^{-3} M sædvanligvis anvendes på virkelige forhold (10^{-6} M) (10). Mabey og Mill (11) har rapporteret om flere eksempler på god overensstemmelse mellem hydrolysehastigheder målt i rent vand og råvand for forskellige kemiske stoffer, forudsat at pH og temperatur måles.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— trivialnavn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af mærkets placering, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysiske/kemiske egenskaber (se punkt 1.5)

— renhed (urenheder) afprøvestoffet

— for mærkede stoffer, renhed af radioaktiv mærkning samt molær aktivitet (hvis relevant).

▼B

— Bufferopløsninger:

— fremstillingsdato og nærmere oplysninger om fremstillingen

— anvendte buffere og vand

— bufferopløsningernes molaritet og pH.

Forsøgsbetingelser:

— dato for forsøgenes udførelse

— anvendt mængde prøvestof

— tilsætning afprøvestoffet: fremgangsmåde og anvendte opløsningsmidler (type og mængde)

— volumen bufret prøvestofopløsning, som er inkuberet

— beskrivelse af det anvendte inkubationssystem

— pH og temperatur under forsøget

— prøvetagningstidspunkter

— ekstraktionsmetode(r)

— metoder til kvantitativ bestemmelse og identifikation afprøvestoffet og dets hydrolyseprodukter i bufferopløsningerne

— antal gentagelser af bestemmelsen.

Resultater:

— de anvendte analysemetoders repeterbarhed og følsomhed

— genfinding (procentangivelser for en gyldig undersøgelse er givet i punkt 1.7.1)

— resultater af gentagne bestemmelser og gennemsnitsværdier, opstillet i tabel

— ved anvendelse afmærket prøvestof, massebalance før, under og efter forsøgene

— resultater af forprøven

— diskussion og fortolkning af resultaterne

— alle oprindelige data og talværdier.

Følgende oplysninger er kun nødvendige, når hydrolysehastigheden bestemmes:

— koncentrationstidskurver over prøvestof og relevante hydrolyseprodukter, for hver pH-værdi og temperatur

— tabeller over beregningsresultater baseret på Arrhenius-ligningen for temperaturen 20 °C/25 °C, sammen med pH, hastighedskonstant (h^{-1} eller $døgn^{-1}$), halveringstid eller DT_{50}, temperatur (°C) herunder konfidensintervaller og korrelationskoefficienter (r^2), eller tilsvarende oplysninger

— formodet hydrolysevej.

▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, vedtaget 12. maj 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Den Europæiske Union (EU) (1995). Kommissionens direktiv 95/36/EF om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler. Bilag V: Skæbne og opførsel i miljøet.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (oktober 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch (red.).

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

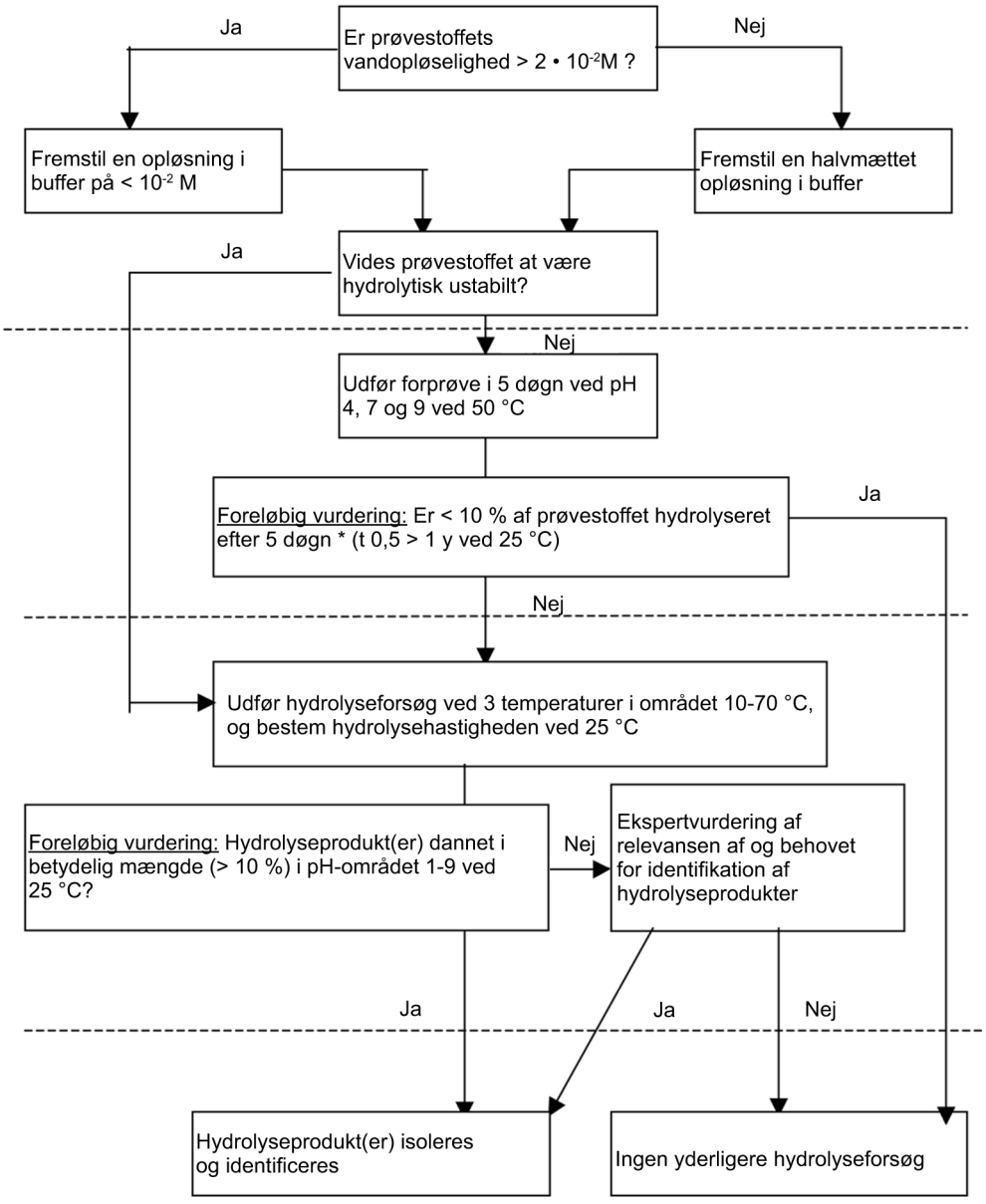
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Skriftlig version af mundtlig præsentation ved 14. årsmøde i Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, november 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Bilag 1

Trinvis forsøgsplan for hydrolyse



* 10 % hydrolyse af et prøvestof ved 50 °C svarer til en halveringstid på ca. 30 døgn eller ca. 1 år ved 25 °C.

▼B

Bilag 2

Definitioner og enheder

SI-enheder skal anvendes i alle tilfælde.

Teststof: ethvert stof, hvad enten det er moderstoffet eller relevante omdannelsesprodukter.

Omdannelsesprodukter: alle stoffer hidrørende fra biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffet.

Hydrolyseprodukter: alle stoffer hidrørende fra hydrolytisk omdannelse af prøvestoffet.

Ved **hydrolyse** forstås reaktionen af et prøvestof RX med vand, resulterende i nettoudskiftning af gruppen X med OH på reaktions stedet:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

I denne forenklede proces er den hastighed, hvormed koncentrationen af RX aftager, givet ved

hastighed = $k\ [H_2O]\ [RX]$ andenordens reaktion

eller

hastighed = $k\ [RX]$ førsteordens reaktion

afhængigt af det hastighedsbestemmende trin. Da vand er til stede i stort overskud i forhold til prøvestoffet, beskrives denne type reaktion sædvanligvis som en pseudoførsteordens reaktion, hvor den iagttagne hastighedskonstant er givet ved relationen

$$k_{obs} = k[H_2O] \qquad [2]$$

og kan bestemmes af udtrykket ([1])

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

hvor

t = tiden

og C_o, C_t = koncentration af RX til tiden 0 og t.

Denne konstant har dimensionen $(tid)^{-1}$, og halveringstiden for reaktionen (den tid, det tager, før 50 % af RX har reageret) er givet ved

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Halveringstid: ($t_{0,5}$) er den tid, der går, før 50 % prøvestoffet er hydrolyseret, når reaktionen kan beskrives ved førsteordens kinetik; den er uafhængig af koncentrationen.

([1]) Hvis kurven over logaritmisk transformerede data som funktion af tiden ikke peger på en lineær funktion (svarende til en førsteordens reaktion), kan hastighedskonstanten for hydrolyse af prøvestoffet ikke bestemmes af ligning [3].

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): er den tid, i løbet af hvilken koncentrationen afprøvestoffet mindskes med 50 %; den er forskellig fra halveringstiden $t_{0,5}$, når reaktionen ikke følger førsteordens kinetik.

Skønsmæssig beregning af k ved forskellige temperaturer

Når hastighedskonstanterne kendes for to temperaturer, kan hastighedskonstanterne for andre temperaturer beregnes ved hjælp af Arrhenius-ligningen:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ eller } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Ved afbildning af ln k mod 1/T fås en ret linje med hældning –E/R,

hvor:

k = hastighedskonstanten, målt ved forskellige temperaturer

E = aktiveringsenergi (kJ/mol)

T = absolut temperatur (K)

R = gaskonstanten (8,314 J/mol.K)

Aktiveringsenergien er beregnet ved regressionsanalyse eller af følgende udtryk:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

hvor: $T_2 > T_1$.

▼B

Bilag 3

Buffersystemer

A. **CLARK OG LUBS:**

Bufferblandinger efter CLARK og LUBS ([1])

Sammensætning	pH
0,2 N HCl og 0,2 N KCl ved 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml	2,2
0,1 M kaliumbiphthalat + 0,1 N HCl ved 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml	3,8
0,1 M kaliumbiphthalat + 0,1 N NaOH ved 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	4,8

([1]) De i tabellerne angivne pH-værdier er beregnet af potentialemålinger ved hjælp af Sørensens standardligninger (1909). De tilsvarende pH-værdier er 0,04 enhed højere end værdierne i tabellerne.

▼B

Sammensætning	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml	6,0

Bufferblandinger efter CLARK og LUBS (fortsat)

0,1 M monokaliumphosphat + 0,1 N NaOH ved 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	8,0
0,1 M $H_3 B0_3$ i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH ved 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF OG VLEESCHHOUWER:**

Citratbuffere efter KOLTHOFF og VLEESCHHOUWER

Sammensætning	pH
0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N HCl ved 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml	3,6
0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N NaOH ved 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	6,0

(*) For at undgå skimmelvækst tilsættes en lille krystal thymol eller tilsvarende.

▼B

C. **SØRENSEN:**

Boratblandinger efter SØRENSEN

Sammensætning		Sørensen 18 °C	Walbum, pH ved		
ml Borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Phosphatblandinger efter SØRENSEN

Sammensætning	pH
0,0667 M monokaliumphosphat + 0,0667 M dinatriumphosphat ved 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOKSICITET FOR REGNORME**

TEST I SYNTETISK JORD

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

I denne laboratorietest tilsættes teststoffet til syntetisk jord, hvori der anbringes orme i 14 dage. Efter denne periode (og eventuelt efter syv dage) undersøges stoffets dødelige virkning på regnormene. Testen giver en metode til i løbet af relativt kort tid at foretage en screening af kemikaliers virkning på regnorme ved optagelse gennem huden eller føden.

1.2. DEFINITION OG ENHED

LC_{50}: Koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af testdyrenes død i løbet af testperioden.

1.3. REFERENCESTOF

Der anvendes regelmæssigt et referencestof til påvisning af, at testsystemets følsomhed ikke har ændret sig signifikant.

Som referencestof anbefales analytisk rent chloracetamid.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Jord er et variabelt medium, så der anvendes en omhyggeligt defineret syntetisk lerjord til denne test. Der holdes voksne regnorme af arten Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) i en veldefineret syntetisk jord, som er behandlet med forskellige koncentrationer af teststoffet. Beholdernes indhold spredes på en bakke 14 dage (og eventuelt syv dage) efter forsøgets indledning, og der optælles for hver koncentration, hvor mange regnorme der har overlevet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Testen er beregnet til at være så reproducerbar som muligt med hensyn til testsubstrat og organisme. Dødeligheden hos kontroldyrene må ikke overstige 10 % ved testens afslutning; ellers er testen ugyldig.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. *Materialer*

1.6.1.1. Testsubstrat

Der anvendes veldefineret syntetisk jord som grundsubstrat.

a) Grundsubstrat (vægtprocent tørstof)

— 10 % sphagnum (så nær pH 5,5 til 6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt)

▼B

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 50 % kaolinit

— ca. 69 % industrielt kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 0,05 til 0,2 mm). Hvis stoffet ikke er tilstrækkeligt let at opslæmme i vand, holdes 10 g pr. testbeholder tilbage for blanding med teststoffet senere

— ca. 1 % calciumcarbonat ($CaCO_3$), pulveriseret, kemisk rent, tilsat for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består af grundsubstrat, teststof og deioniseret vand.

Vandindholdet svarer til ca. 25 til 42 vægtprocent af grundsubstratets tørstof. Substratets vandindhold bestemmes ved tørring af en prøve til konstant vægt ved 105 °C. Hovedkriteriet er, at den syntetiske jord er befugtet så meget, at der ikke er noget stående vand. Blandingen foretages omhyggeligt, således at der bliver en jævn fordeling af teststoffet og substratet. Metoden for tilsætning af teststoffet til substratet skal rapporteres.

c) Kontrolsubstrat

Kontrolsubstratet bestir af grundsubstrat og vand. Hvis der anvendes et tilsætningsstof, skal et ekstra kontrolsubstrat indeholde samme mængde af tilsætningsstoffet.

1.6.1.2. Testbeholdere

Glasbeholdere med er rumfang på ca. en liter (hensigtsmæssigt tildækket med plastlåg, skåle eller plastfolie med ventilationshuller), fyldt med en mængde vådt test- eller kontrolsubstrat svarende til 500 g substrattørstof.

1.6.2. *Testbetingelser*

Beholderne opbevares i klimakamre ved en temperatur pi 20 ± 2 °C og i konstant lys; Lysstyrken bør være 400 til 800 lux.

Testperioden er på 14 dage, men dødeligheden kan eventuelt vurderes syv dage efter testens indledning.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Testkoncentrationer

Koncentrationerne af teststof udtrykkes som stoffets vægt i forhold til grundsubstratets tørstofvægt (mg/kg).

Forprøve

Det koncentrationsområde, der netop forårsager dødelighed fra 0 til 100 % kan bestemmes ved en forprøve, der giver viden om de koncentrationsintervaller, der skal anvendes ved den endelige test.

▼B

Stoffet bør testes i følgende koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 og 0,1 mg/stof/kg testsubstrat (tørstofvægt).

Hvis der skal foretages en fuldstændig endelig test, vil én testgruppe pr. koncentration og én til den ubehandlede kontrolgruppe med hver ti orme være tilstrækkelig til forprøven.

Endelig test

Resultaterne af forprøven anvendes til at vælge mindst fem koncentrationer i en kvotientrække, der går fra 0 til 100 % dødelighed, og hvor den konstante faktor ikke må være over 1,8.

Ved test med disse koncentrationsrækker vil LC_{50}-værdien og dens konfidensgrænser kunne skønnes med størst mulig nøjagtighed.

Ved den endelige test anvendes der mindst fire testgrupper pr. koncentration og fire ubehandlede kontrolgrupper med hver ti orme. Resultaterne af disse gentagne grupper angives som en middelværdi og en standardafvigelse.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50}-intervallet.

Blanding af grundsubstratet og teststoffet

Når det er muligt, tilberedes teststoffet uden anden tilsætning end vand. Umiddelbart før testens indledning blandes en emulsion eller dispersion af teststoffet i deioniseret vand eller andet opløsningsmiddel med grundsubstratet eller sprøjtes jævnt ud over dette med en fin kromatografisprøjte eller lignende.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform).

Kun midler, der let fordamper, må bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Testsubstratet beluftes inden brug, Den fordampede vandmængde erstattes. Kontrolsubstratet må indeholde eventuelle tilsætningsstoffer i samme mængde.

Hvis teststoffet ikke kan opløses, dispergeres eller emulgeres i organiske opløsningsmidler, blandes en blanding af finsand af formalet kvarts og den til behandling af 500 g tørstofvægt syntetisk jord nødvendige mængde teststof med 490 g tørstofvægt testsubstrat.

For hver testgruppe anbringes en mængde vådt testsubstrat svarende til 500 g tørstofvægt i hver glasbeholder, og ti regnorme, der i 24 timer er blevet tilvænnet i et lignende vådt grundsubstrat og derefter hurtigt afskyllet og afdryppet på filtrerpapir før brugen, anbringes på testsubstratets overflade.

▼B

Beholderne tildækkes med perforerede plastlåg, skåle eller folie for at forhindre, at substratet indtørrer, og de opbevares under testbetingelser i 14 dage.

Vurderingerne foretages 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning. Substratet spredes på en plade af glas eller rustfrit stål. Regnormene undersøges, og antallet af overlevende regnorme bestemmes. Regnorme anses for døde, hvis de ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning af forender.

I tilfælde af at undersøgelsen foretages efter syv dage, fyldes substratet atter i beholderen, og de overlevende regnorme genanbringes på den samme testsubstratoverflade.

1.6.4. *Testorganismer*

Testorganismerne bør være voksne Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) (mindst to måneder gamle med bælte) af en vægt (våd) på 300 til 600 mg. (Med hensyn til opdrætningsmetode henvises til tillægget).

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING OG VURDERING AF RESULTATERNE

De anvendte teststofkoncentrationer rapporteres med henvisning til den procentvise dødelighed for hver koncentration.

Når de opnåede data er dækkende, kan LC_{50} og dens konfidensgrænser (p = 0,05) bestemmes ved brug af standardmetoder (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eller tilsvarende metode). LC_{50} angives som mg teststof pr, kg testsubstrat (tørstofvægt).

I de tilfælde, hvor koncentrationskurvens hældning er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er en grafisk bestemmelse af denne værdi tilstrækkelig.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50}-intervallet.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med ovenstående kvalitetskriterier

— angivelse af den foretagne test (forprøve og/eller endelig test)

— nøje beskrivelse af testbetingelserne eller angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med metoden; eventuelle afvigelser skal rapporteres

— nøje beskrivelse af, hvorledes teststoffet er blevet iblandet i grundsubstratet

— oplysninger om testorganismer (art, alder, gennemsnitsvægt samt minimums- og maksimumsvægt, betingelserne for avl og opdrætning samt leverandør)

▼B

— angivelse af den anvendte metode til bestemmelse af LC_{50}

— testresultaterne, herunder alle anvendte data

— beskrivelse af observerede symptomer eller adfærdsændringer hos testorganismerne

— dødelighed i kontrolgrupperne

— LC_{50} eller højeste testkoncentration uden dødelighed og laveste testkoncentration med en dødelighed på 100 % 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning

— afbildning af koncentrationsresponskurven

— resultater, der er opnået med referencestoffet enten i forbindelse med den pågældende test eller ved tidligere kvalitetskontrolundersøgelser.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977. Biology of Earthworms. London: Chapman and Hall, 331 pp.

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

(4) Litchfield, J. T.and Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluaring dose-effect experiments J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 99-113.

(5) EEC 1983. Development of a standardized labotatory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR. 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Tillæg

Avl og opdrætning af ormene før test

Med henblik på avl anbringes 30 til 50 voksne orme i en avlekasse med frisk substrat og fjernes efter 14 dage. Disse dyr kan bruges til avl af senere grupper. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne (under de foreskrevne betingelser efter to til tre måneders forløb).

Avls- og opdrætningsbetingelser

Klimakammer:	temperatur 20 ± 2 °C, helst med konstant lys (lysintensitet 400 til 800 lux).
Avlekasser:	Egnede lave beholdere med et rumfang på 10 til 20 l.
Substrat:	Eisenia foetida kan opdrættes i forskellige dyreekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Substratet må have en pH-værdi på ca. 6 til 7 (justeret med calciumcarbonat) og lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration). Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Andre egnede fremgangsmåder ud over ovennævnte metode kan benyttes.

Anmærkning: Der findes to racer af Eisenia foetida, som nogle systematikere har klassificeret som arter (Bouche, 1972). De er morfologisk set omtrent ens, men den ene, Eisenia foetida foetida, har typisk tværgående striber på leddene, hvad den anden, Eisenia foetida andrei, ikke har, og dennes farve er rødbroget. Så vidt muligt bør Eisenia foetida andrei anvendes. Andre arter kan anvendes, hvis den fornødne metodik er til rådighed.

▼B

C.9. **BIOLOGISK NEDBRYDNING**

ZAHN-WELLENS TEST

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Metoden har til formål at vurdere vandopløselige ikke flygtige organiske stoffers potentielle fuldstændige bionedbrydelighed, når de skal udsættes for forholdsvis høje koncentrationer af mikroorganismer under en statisk test.

Der kan forekomme fysisk/kemisk adsorption på de opslæmmede artikler, og der må tages hensyn hertil, når resultaterne fortolkes (jf. 3.2).

De stoffer, der skal undersøges, anvendes i koncentrationer svarende til DOC-værdier i området 50 til 400 mg/l eller COD-vædier i området 100 til 1 000 mg/l (DOC = opløst organisk kulstof; COD = kemisk iltforbrug). Disse forholdsvis høje koncentrationer har den fordel, at de i analytisk henseende er pålidelige. Forbindelser med toksiske egenskaber kan hæmme eller hindre nedbrydningsprocessen.

Ved denne metode anvendes måling af koncentrationer af opløst organisk kulstof eller af det kemiske iltforbrug til bedømmelse af teststoffets fuldstændige biologiske nedbrydning.

Samtidig anvendelse af en specifik analysemetode kan muliggøre vurdering af stoffets primære biologiske nedbrydning (dvs. den oprindelige kemiske forbindelses forsvinden).

Metoden finder kun anvendelse pi de organiske teststoffer, som ved koncentrationen under testen:

— er opløselige i vand under forsøgsbetingelserne

— har forsvindende lavt damptryk under forsøgsbetingelserne

— ikke hæmmer bakterier

— kun adsorberes i testsystemet i begrænset omfang

— ikke forsvinder fra testopløsningen som følge af skumning.

Oplysninger om mængdeforholdet mellem teststoffets hovedbestanddele vil være til nytte ved fortolkning af resultaterne, især hvis disse er lave eller usikre.

Ved fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer er det ønskeligt at have oplysninger om stoffets giftvirkning over for mikroorganismer.

▼B

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Nedbrydningsgraden ved testens afslutning anføres således: Biologisk nedbrydelighed i Zahn-Wellens test:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

hvor:

D_T = biologisk nedbrydning (%) ved tidspunktet T

C_A = DOC (eller COD)-værdier i forsøgsblandingen, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l). (DOC = opløst organisk kulstof, COD = kemisk iltforbrug)

C_T = DOC- eller COD-værdier i forsøgsblandingen ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l)

C_B = DOC- eller COD-værdi for blindprøven ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l)

C_{BA} = DOC- eller COD-værdi for blindprøven, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l).

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent.

Den procentvise nedbrydning er angiver som den procentvise DOC- (eller COD-) fjernelse af teststoffet.

Forskellen mellem den værdi, der er målt efter tre timer, og den beregnede, eller helst målte, startværdi kan give nyttige oplysninger om stoffets eliminering (jf. 3.2 »Fortolkning af resultater«).

1.3. REFERENCESTOFFER

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelse af nye stoffer; der kan dog endnu ikke anbefales bestemte referencestoffer.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Aktiveret slam, uorganiske næringsstoffer og teststoffet, der er den eneste kulstofkilde i vandig opløsning, anbringes sammen i en glasbeholder på 1 til 4 liter, som er forsynet med omrøring og beluftning. Blandingen omrøres og beluftes ved 20 til 25 °C under indirekte belysning eller mørke i op til 28 dage. Nedbrydningsprocessen følges ved bestemmelse af DOC- (eller COD-) værdier i den filtrerede opløsning en gang dagligt eller regelmæssigt med et andet passende mellemrum. Forholdet mellem den eliminerede DOC (eller COD) efter hvert tidsrum og værdier tre timer efter starten udtrykkes som procentvis biologisk nedbrydning og er et mål for nedbrydningsgraden på dette tidspunkt. Resultatet afbildes mod tiden, hvorved kurven over biologisk nedbrydning fremkommer.

Hvis der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i det oprindelige stofs koncentration som følge af biologisk nedbrydning måles (primær bionedbrydelighed).

▼B

1.5. KVALITETSKRITERIER

Det er ved ringtest godtgjort, at denne metodes reproducerbarhed er tilfredsstillende.

Metodens følsomhed afhænger hovedsagelig af blindprøvens variationer og i mindre grad af nøjagtigheden ved bestemmelsen af opløst organisk kulstof og teststofkoncentrationen i væsken.

1.6. BESKRIVELSE AF FREMGANGSMÅDEN

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Reagenser

vand: drikkevand med mindre end 5 mg organisk kulstof pr. liter. Koncentrationen af calcium- og magnesiumioner må ikke overstige 2,7 mmol/l tilsammen; i modsat fald må der fortyndes passende med deioniseret eller destilleret vand

svovlsyre, analyseren (A.R.):	50 g/l
natriumhydroxidopløsning, A.R.:	40 g/l

opløsning af uorganiske næringsstoffer: i 1 l deioniseret vand opløses:

Ammoniumchlorid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
Natriumdihydrogenphosphat, $NaH_2PO_4 . 2H_2O$, A.R.:	33,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
Dikaliummonohydrogenphosphat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Blandingen fungerer dels som næringsstofkilde, dels som buffersystem.

1.6.1.2. Apparatur

glasbeholdere på 1 til 4 (f.eks. cylindriske beholdere)

omrører med rørehoved af glas eller metal på en passende aksel (omrøreren bør rotere 5 til 10 cm over beholderens bund). Der kan i stedet anvendes en magnetomrører med en 7 til 10 cm lang magnetpind

glasrør med indvendig diameter på 2 til 4 mm til beluftning. Rørets åbning bør befinde sig ca. 1 cm over beholderens bund

centrifuge (ca. 3 550 g)

pH-meter

apparat til måling af opløst ilt

papirfiltre

▼B

apparatur til membranfiltrering

membranfiltre med porestørrelse 0,45 μm. Membranfiltre er kun egnede, hvis der er vished for, at de hverken afgiver kulstof eller absorberer stoffet under filtreringen

analyseudstyr ti! bestemmelse af indholdet af organisk kulstof og det kemiske iltforbrug.

1.6.1.3. Tilberedning af inoculum

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg vaskes (flere gange) med vand (jf. ovenfor) ved centrifugering eller dekantering.

Det aktiverede slam skal være i passende stand. Sådant slam kan fås fra et velfungerende anlæg til spildevandsrensning. For at få så mange forskellige bakteriestammer som muligt kan det være bedre at blande inocula fra forskellige kilder (f.eks. forskellige rensningsanlæg, jordekstrakter, flodvand osv.).

Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres, jf. »egnethedskontrol«.

1.6.1.4. Fremstilling af testopløsningerne

Til testbeholderen sættes 500 ml vand, 2,5 ml opløsning af uorganiske næringsstoffer pr. liter samt en mængde aktiveret slam, der svarer til 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter færdigblanding. Der tilsættes en så stor mængde stamopløsning af teststoffer, at den færdige blanding får en DOC-koncentration på 50 til 400 mg/l. Det tilsvarende COD-interval er 100 til 1 000 mg/l. Der fyldes op til i alt 1 til 4 l med vand. Valg af det samlede volumen afhænger af det antal prøver, der skal udtages til DOC- eller COD-bestemmelser, og det nødvendige analysevolumen.

Normalt kan et volumen på 2 l betragtes som tilstrækkeligt. Mindst én kontrolbeholder (blindprøve) sættes i gang samtidig med hver testserie; den indeholder kun aktiveret slam og opløsning af uorganiske næringsstoffer fortyndet med vand til samme totalvolumen som i testbeholderne.

1.6.2. *Testens gennemførelse*

Testbeholderne omrøres med magnetomrørere eller propelomrørere under indirekte belysning eller i mørke ved 20 til 25 °C. Beluftning sker med komprimeret luft, der om nødvendigt renses med et vatfilter og en vaskeflaske. Det må påses, at slammet ikke bundfælder, og at iltkoncentrationen ikke falder til under 2 mg/l.

pH-værdien kontrolleres regelmæssigt (f.eks. dagligt) og indstilles om nødvendigt til pH 7 til 8.

▼B

Lige før prøveudtagningen kompenseres der for tab ved fordampning ved tilsætning af deioniseret eller destilleret vand. Det kan f.eks. anbefales at afmærke væskehøjden i beholderen, før testen startes. Der sættes nye mærker efter hver prøveudtagning (uden beluftning og omrøring). De første-prøver udtages altid tre timer efter testens start, således at det kan konstateres, om testmaterialet adsorberes på det aktiverede slam.

Elimineringen af testmaterialet følges ved DOC- eller COD-bestemmelser dagligt eller regelmæssigt med et andet interval. Prøverne fra testbeholderen og blindforsøget filtreres gennem et omhyggeligt vasket papirfilter. De første 5 ml filtrat bortkastes. Slam, der er vanskeligt at filtrere, kan fjernes ved først at centrifugere i ti min. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC og COD. Testens løber i op til 28 dage.

Anmærkning: Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter. Membranfiltrene må hverken afgive eller adsorbere organisk materiale.

Egnethedskontrol af det aktiverede slam

I hver testserie bør indgå en beholder, der indeholder et kendt stof, således at man kan kontrollere egnetheden af det aktiverede slam. Til dette formål er diethylenglycol fundet egnet.

Adaptation

Hvis der foretages analyser med forholdsvis korte mellemrum (f.eks, dagligt), vil adaptation klart fremgå af nedbrydningskurven (jf. figur 2). Testen bør derfor ikke sættes i gang umiddelbart før weekenden.

Hvis der forekommer adaptation ved slutningen af perioden, kan testen fortsættes, indtil nedbrydningen er afsluttet.

Anmærkning: Hvis der er behov for større viden om det adapterede slams opførsel, udsattes det samme aktiverede slam endnu engang for det samme testmateriale efter følgende fremgangsmåde:

Omrøringen og beluftningen standses, og man lader det aktiverede slam bundfælde sig. Den ovenstående væske fjernes, der fyldes op til 2 l med vand og omrøres i 15 minutter, og blandingen henstår til ny bundfældning. Efter fjernelse af den ovenstående væske anvendes det tilbageblevne slam til gentagelse af testen med det samme materiale som under punkt 1.6.1.4 og 1.6.2. Det aktiverede slam kan isoleres ved centrifugering i stedet for bundfældning.

Det adapterede slam kan eventuelt blandes med frisk slam, så man når op på i alt 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter.

▼B

Analyse

Normalt filtreres prøver gennem et omhyggeligt vasket papirfilter (til vask anvendes deioniseret vand).

Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter (0,45 μm).

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i prøvefiltraterne (de første 5 ml bortkastes) med TOC-instrumentet. Hvis filtratet ikke kan analyseres-samme dag, skal det opbevares i køleskab til næste dag. Længere tids opbevaring kan ikke anbefales.

COD-koncentrationen bestemmes i prøvefiltraterne med et COD-analyseudstyr efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i henvisning (2) nedenfor.

2. **DATA OG VURDERING**

Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC- og COD-koncentrationerne i prøverne ifølge 1.6.2. Nedbrydningen ved tidspunktet T beregnes med den formel (med definitioner), der anført under 1.2.

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent. Den nedbrydning, der opnås ved slutningen af testen, anføres som »den biologiske nedbrydelighed ved Zahn-Wellens test«.

Anmærkning: Hvis der opnås fuldstændig nedbrydning før testperioden er udløbet og dette resultat bekræftes ved endnu en analyse den følgende dag, kan testen afsluttes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stoffets begyndelseskoncentration

— alle andre oplysninger og forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, et eventuelt referencestof og blindforsøget

— koncentrationen efter tre timer

— kurve over biologisk nedbrydning med forklaring

— hvornår og hvor prøveorganismerne er udtaget, adaptionsgrad, anvendt koncentration osv.

— fyldestgørende begrundelse for alle afvigelser fra fremgangsmåden.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Gradvis fjernelse af DOC (COD) i løbet af dage eller uger viser, at teststoffet nedbrydes biologisk.

▼B

Fysisk/kemisk adsorbtion kan dog i visse tilfælde spille en vis rolle, og et tegn herpå er, at der inden for de første tre timer sker fuldstændig eller delvis fjernelse, og at forskellen mellem supernatantvæsken fra kontrolforsøget og prøven bliver liggende på et uventet lavt niveau.

Det er nødvendigt at foretage yderligere testning, hvis der skal skelnes mellem biologisk nedbrydning (eller delvis biologisk nedbrydning) og adsorption.

Dette kan gøres på flere måder, mest troværdigt ved at anvende supernatantvæsken som inoculum i en basissat test (helst en respirometrisk test).

Teststoffer, der giver høj fjernelse af DOC (COD), som ikke skyldes adsorption, ved denne test, bør betragtes som potentielt biologisk nedbrydelige. Delvis fjernelse, som ikke skyldes adsorption, betyder, at kemikaliet i hvert fald i et vist omfang nedbrydes biologisk. Ringe eller ingen fjernelse af DOC (COD) kan skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismerne; dette kan undertiden også vise sig ved, at slammet opløses og forsvinder, hvorved supernatantvæsken bliver uklar. Testen bør gentages med en lavere koncentration af teststof.

Anvendelse af en stofspecifik analysemetode eller ^{14}C-mærket teststof kan give større følsomhed. Hvis der anvendes ^{14}C-mærket teststof, vil påvisning af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der er tale om biologisk nedbrydning.

Dersom resultaterne anføres som primær biologisk nedbrydning, bør der om muligt anføres en forklaring pi den kemiske strukturændring, som fører til, at analyseresultaterne for det oprindelige teststof falder.

Valget af analysemetode skal underbygges, og analyseresultaterne for blindprøven skal anføres.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981 Test Guideline 302 B. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Bilag V C.9 Nedbrydning: Kemisk iltforbrug. Kommissionens direktiv 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende,* L 251 af 19.9.1984.

▼B

Tillæg

EKSEMPLER PÅ EVALUERING

Organisk forbindelse:	4-ethoxybenzoesyre
Teoretisk testkoncentration:	600 mg/l
Teoretisk DOC:	390 mg/l
Inoculum	rensningsanlægget ...
Koncentration:	1 g tørstof pr. liter
Eventuel adaptation:	ikke adapteret
Analyse:	DOC-bestemmelse
Testmængde:	3 ml
Kontrolstof:	diethylenglycol
Stoffets toksicitet	ingen giftvirkning under 1 000 mg/l anvendt prøve: fermeteringsglas

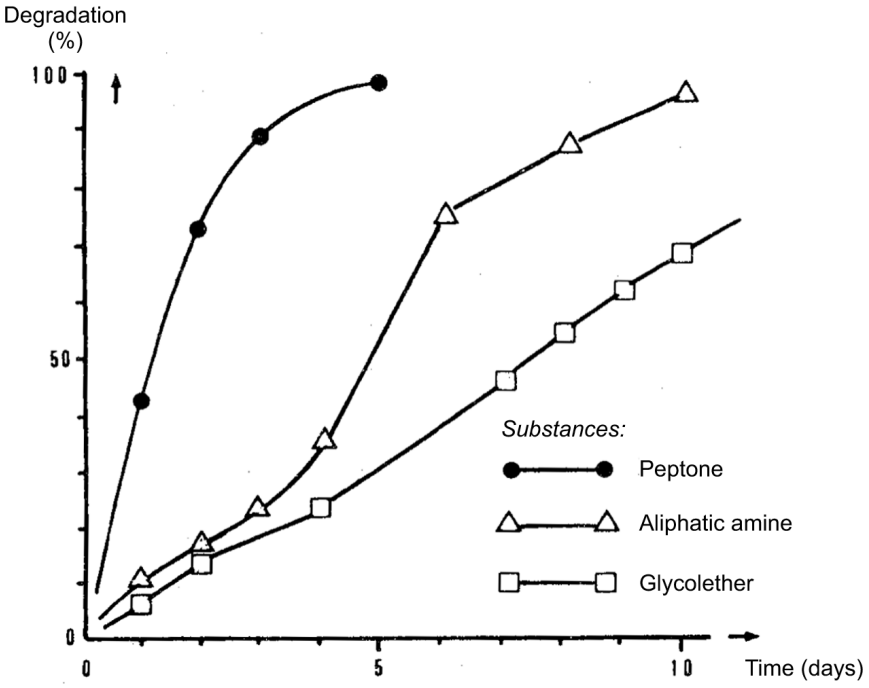
Tidspunkt	Kontrolstof				Teststof		
	Blindprøve DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC netto mg/l	Nedbrydning %	DOC ([1]) mg/l	DOC netto mg/l	Nedbrydning %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 timer	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dage	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dage	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dage	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dage	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dage	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dage	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dage	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Gennemsnit af tredobbeltbestemmelse.

▼B

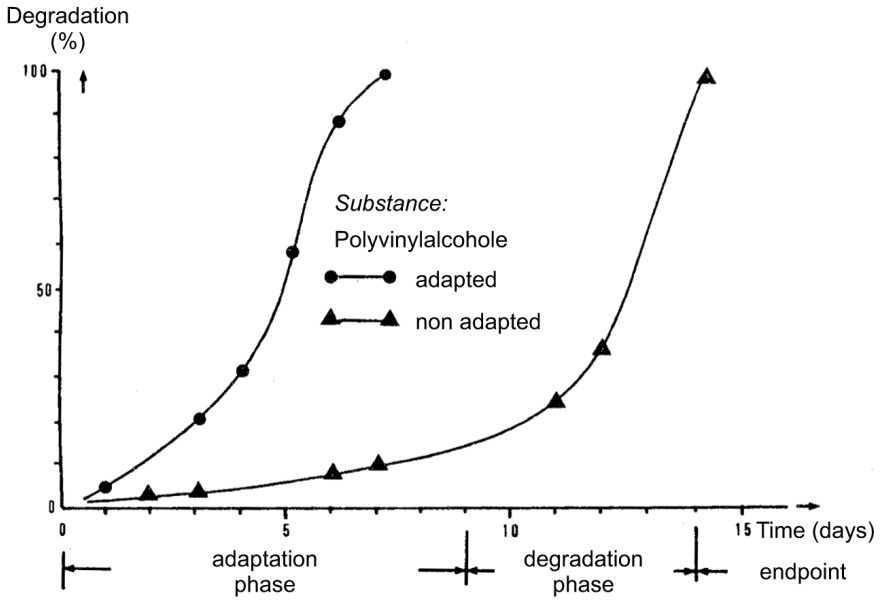
Figur 1

Eksempler på kurver over biologisk nedbrydning



Figur 2

Eksempler på slamadaptation



▼M4

C.10. **SIMULERINGSFORSØG VEDRØRENDE AEROB SPILDEVANDSRENSNING: C.10.A: AKTIVEREDE SLAMENHEDER — C.10.B: BIOFILM**

C.10.A:. Aktiverede slamenheder

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 303 (2001). I 1950'erne opdagede man, at nye overfladeaktive stoffer forårsagede omfattende skumdannelse i spildevandsrensningsanlæg og i floder. De blev ikke fuldstændigt elimineret i den aerobe behandling, og i visse tilfælde begrænsede de elimineringen af andre organiske stoffer. På den baggrund blev der indledt mange undersøgelser af, hvordan overfladeaktive stoffer kunne fjernes fra spildevand, og om nye industrifremstillede kemikalier kunne indgå i spildevandsrensning. Til det blev der anvendt to modelenheder, der repræsenterede de to hovedtyper af aerob biologisk spildevandsrensning (aktiveret slam og nedsivningsfiltrering). Det ville have været umuligt og meget dyrt at distribuere alle nye kemikalier og overvåge store rensningsanlæg, selv på lokalt plan.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Aktiverede slamenheder

2. Modeller for aktiverede slamenheder er beskrevet i størrelser fra 300 ml op til ca. 2 000 ml. Nogle efterlignede nøje fuldskalaanlæg med tanke til bundfældning af slam, hvor det bundfældede slam blev pumpet tilbage til beluftningstanken, mens andre ikke var udstyret med bundfældningsanlæg, f.eks. Swisher (1). Størrelsen på forsøgsenhederne er et kompromis. De skal på den ene side være store nok til mekanisk drift og produktion af et tilstrækkeligt volumen af prøver, uden at det påvirker driften, og på den anden side må de ikke være så store, at det stiller for store krav til plads og materialeforbrug.

3. To typer forsøgsenheder, der anvendes hyppigt og med tilfredsstillende resultat, er Husmann-enheder (2) og Porous Pot-enheder (porøse krukker) (3) (4), der først blev anvendt i forsøg med overfladeaktive stoffer. Begge disse typer er beskrevet i denne testmetode. Andre typer har også været anvendt med tilfredsstillende resultater, f.eks. Eckenfelder (5). På grund af de relativt høje omkostninger og den store arbejdsindsats, der kræves for at udføre denne simuleringstest, blev der parallelt med disse gennemført enklere og billigere screeningstest, som er beskrevet i kapitel C.4 A-F i dette bilag (6). Erfaringer med mange overfladeaktive stoffer og andre kemikalier har vist, at de stoffer, der bestod screeningstestene (let bionedbrydelige), også blev nedbrudt i simuleringstesten. Nogle af de stoffer, der ikke bestod screeningstestene, bestod testene for iboende bionedbrydelighed (kapitel C.12 (7) og C.19 (8) i dette bilag), men kun nogle fra denne gruppe blev nedbrudt i simuleringstesten, hvorimod de kemikalier, der ikke bestod testene for iboende bionedbrydelighed, ikke blev nedbrudt i simuleringstestene (9) (10) (11).

4. I visse tilfælde er det tilstrækkeligt at gennemføre simuleringstests under et enkelt sæt driftsbetingelser. Resultaterne udtrykkes som den procentvise eliminering af testkemikaliet eller af opløst organisk kulstof (DOC). En sådan test beskrives i denne testmetode. I modsætning til den foregående version af dette kapitel, der kun beskrev én type forsøgsenheder til behandling af syntetisk spildevand i koblet tilstand, der anvendte en forholdsvis grov slamoverløbsmetode, giver denne tekst mulighed for en række variationer. Alternativer til typen af forsøgsenheder, virkningsmåde samt spildevands- og slambortskaffelse beskrives. Denne tekst ligger tæt op ad teksten i

▼M4

ISO 11733 (12), der blev nøje gennemgået i forbindelse med forberedelsen. Metoden har dog ikke været underkastet en ringtest.

5. Til andre formål skal koncentrationen af testkemikaliet i udløbet kendes mere præcist, og der er derfor behov for en mere omfattende metode. Overløbsprocenten for slam skal f.eks. kontrolleres mere præcist hele døgnet og i løbet af hele testperioden, og enhederne skal fungere ved forskellige overløbsprocenter. For at opnå en fyldestgørende metode bør testene ligeledes gennemføres ved to eller tre forskellige temperaturer. En sådan metode er beskrevet af Birch (13) (14) og sammenfattet i tillæg 6. Den nuværende viden er imidlertid ikke tilstrækkelig til at afgøre, hvilken af de kinetiske modeller der kan anvendes i forbindelse med bionedbrydning af kemikalier ved spildevandsrensning og i vandmiljøet generelt. Anvendelsen af Monod-kinetik, der beskrives i tillæg 6 som et eksempel, er begrænset til kemikalier, der forekommer i en koncentration på 1 mg/l og derover, men dette er efter nogle forskeres opfattelse endnu ikke dokumenteret. Tillæg 7 omhandler test ved koncentrationer, der mere realistisk afspejler koncentrationerne i spildevand. Disse test og testene i tillæg 6 er dog anført i tillæg og ikke som separate testmetoder.

Filtre

6. Det har været meget mindre fokus på modeller med nedsivningsfiltre. Det skyldes sandsynligvis, at de er mere besværlige og ikke så kompakte som modeller baseret på aktiveret slam. Gerike et al. har udviklet nedsivningsfiltre og anvendt dem i koblet tilstand ((15). Disse filtre var relativt store (højde 2 m, volumen 60 l), og hvert filter krævede en spildevandsmængde på helt op til 2 l/h. Baumann et al. (16) simulerede nedsivningsfiltre ved at sætte strips af »polyesterfleece« ind i rør på 1 m (14 mm indvendig diameter), efter at stripsene havde været nedsænket i koncentreret aktiveret slam i 30 minutter. Testkemikaliet blev som eneste C-kilde i en opløsning af mineralsalte hældt ned i det lodrette rør, hvorefter den biologiske nedbrydning blev vurderet ud fra målinger af DOC i udløbet og CO_2 i den udledte gas.

7. Biofiltre er blevet simuleret på en anden måde (15). De indre overflader af roterende rør, der var skråtstillet i en spids vinkel i forhold til vandret, blev tilført spildevand (ca. 250 ml/h) med og uden testkemikaliet. De opsamlede udløb blev derefter analyseret for opløst organisk kulstof (DOC) og/eller det specifikke testkemikalie.

TESTENS PRINCIP

8. Denne metode er udviklet til at bestemme elimineringen og den primære og/eller ultimative biologiske nedbrydning af vandopløselige organiske kemikalier ved hjælp af aerobe mikroorganismer i et kontinuerligt drevet testsystem, der simulerer processen for aktiveret slam. Et let biologisk nedbrydeligt organisk materiale og det organiske testkemikalie forsyner mikroorganismerne med kulstof og energi.

9. To kontinuerligt drevne testenheder (anlæg med aktiveret slam eller porøse krukker) køres parallelt under identiske betingelser, der vælges, så de passer til testens formål. Normalt er den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid seks timer, og den gennemsnitlige slamalder (slamretentionstid) er 6-10 dage. Slam bortskaffes ved hjælp af én af to metoder, hvor testkemikaliet normalt tilsættes indløbet (organisk medium) på den ene enhed i en koncentration på mellem 10 mg/l DOC og 20 mg/l DOC. Den anden enhed bruges som kontrolenhed for at bestemme den biologiske nedbrydning af det organiske medium.

▼M4

10. I hyppigt udtagne prøver af udløbet bestemmes først og fremmest det opløste organiske kulstof eller det kemiske iltforbrug (COD). Ligeledes bestemmes ud fra specifikke analyser koncentrationen af testkemikaliet (hvis påkrævet) i spildevandet fra den enhed, der får tilført testkemikaliet. Det antages, at forskellen mellem koncentrationerne af DOC eller COD i udløbet fra test- og kontrolenhederne skyldes testkemikaliet eller dets organiske metabolitter. Forskellen sammenlignes med koncentrationen af DOC eller COD i indløbet, der skyldes det tilførte testkemikalie, med henblik på at bestemme elimineringen af testkemikaliet.

11. Bionedbrydning kan normalt adskilles fra bioadsorption ved omhyggeligt at undersøge kurven for elimineringstid og bekræftes normalt af en test for umiddelbar bionedbrydning, hvor der anvendes et akklimatiseret inokulum fra den enhed, der får tilført testkemikaliet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

12. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Normalt kan flygtige og uopløselige kemikalier ikke testes, medmindre der træffes særlige forholdsregler (se tillæg 5). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal også kendes for at kunne beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrenes målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), opløst organisk kulstof (DOC) og kemisk iltforbrug (COD).

13. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4) kan bruges ved valg af hensigtsmæssige testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

14. I den første anvendelse af denne simuleringstest (kontroltest) i forbindelse med primær bionedbrydning af overfladeaktive stoffer skal der fjernes over 80 % af det specifikke kemikalie, inden det overfladeaktive stof må markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof må markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for eliminering benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. Resultater har en tendens til at følge et mønster med alt eller intet. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for bionedbrydelighed.

15. Der er relativt få kemikalier (f.eks. overfladeaktive stoffer) til stede i spildevand i de koncentrationer (ca. 10 mg C/l), der anvendes i denne test. Nogle kemikalier kan være hæmmende ved disse koncentrationer, mens kinetikken for eliminering af andre kemikalier kan være forskellig ved lave koncentrationer. En mere præcis vurdering af nedbrydningen kunne gennemføres ved hjælp af modificerede metoder, hvor man benytter realistisk lave koncentrationer af testkemikaliet, og de indsamlede data kunne bruges til at beregne kinetiske konstanter. De nødvendige forsøgsteknikker er imidlertid endnu ikke fuldt validerede, og de kinetiske modeller, der beskriver reaktionerne med hensyn til bionedbrydning, er heller ikke udarbejdet (se tillæg 7).

▼M4

REFERENCEKEMIKALIER

16. For at sikre, at forsøget gennemføres korrekt, bør kemikalier, hvis opførsel kendes, jævnligt testes sideløbende med undersøgelsen af testkemikalier. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre, 1-naphthoesyre osv. (9) (10) (11).

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

17. Der har udarbejdet langt færre rapporter om simuleringstest end om test for let bionedbrydelighed. Reproducerbarheden mellem (samtidige) replikater er god (inden for 10-15 %) for testkemikalier, der er nedbrudt 80 % eller mere, mens der for mindre nedbrudte kemikalier er større variationer. Ligeledes er der i forbindelse med visse borderline-kemikalier konstateret meget spredte resultater (f.eks. 10 % og 90 %) på forskellige tidspunkter i løbet af testperioden på ni uger.

18. Der er konstateret meget begrænset forskel i de resultater, der er opnået med de to typer forsøgsenheder. Visse kemikalier er dog i højere grad og mere konsistent blevet nedbrudt i forbindelse med husholdningsspildevand end med syntetisk spildevand som defineret af OECD.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparatur

Testsystem

19. Testsystemet for et enkelt testkemikalie består af en testenhed og en styreenhed. I de tilfælde, hvor der kun gennemføres specifikke analyser (primær bionedbrydning), kræves der dog kun en testenhed. En og samme styreenhed kan benyttes til flere forskellige testenheder, der modtager enten de samme eller forskellige testkemikalier. I tilfælde af kobling (tillæg 3) skal hver enkelt testenhed have sin egen styreenhed. Testsystemet kan være en aktivslamanlægsmodel, dvs. en Husmann-enhed (tillæg 1, figur 1) eller en porøs krukke (tillæg 1, figur 2). I begge tilfælde kræves opbevaringstanke af tilstrækkelig størrelse til indløb og udløb, og der kræves pumper til dosering af indløbet enten blandet med opløsningen af testkemikaliet eller separat.

20. Hver aktivslamanlægsenhed består af en beluftningstank med en kendt kapacitet på ca. 3 l aktiveret slam og en separator (sekundær klaringstank), der indeholder ca. 1,5 l. De anførte volumener kan i et vist omfang ændres ved at justere separatorens højde. Tanke af forskellige størrelser tillades, hvis de benyttes med tilsvarende hydrauliske belastninger. Hvis det ikke er muligt at holde temperaturen i testlokalet inden for det ønskede område, anbefales det at benytte tanke med vandkappe med temperaturreguleret vand. En luftpumpe eller doseringspumpe pumper det aktiverede slam fra separatoren over i beluftningstanken enten kontinuerligt eller intermitterende med regelmæssige intervaller.

21. Systemet med porøse krukker består af en indre porøs cylinder med en konisk bund, der er monteret inde i en lidt større tank af samme form, men som er fremstillet af et vandtæt plastmateriale. Et velegnet materiale til en porøs krukke er porøs polyethylen med en maksimal porestørrelse på 90 μm og en tykkelse på 2 mm. Slammet adskilles fra det behandlede organiske materiale i kraft af differentieret passage gennem den porøse væg. Udløbet opsamles i det ringformede rum, hvorfra det løber over i opsamlingstanken. Der sker ingen bundfældning, og der intet returløb af slam. Hele systemet kan opstilles i et termostatstyret vandbad. Porøse krukker kan i starten blive tilstoppede og dermed løbe over. I så fald skal den porøse foring udskiftes

▼M4

med en ren foring, efter at slammet er suget fra krukken over i en ren spand, og den tilstoppede foring er fjernet. Efter aftørring af den vandtætte udvendige cylinder monteres en ren foring, og slammet returneres til krukken. Slam, der sidder fast på siderne af den tilstoppede foring, skrabes også omhyggeligt af og hældes tilbage. Rengør først tilstoppede krukker med en tynd vandstråle, så fastsiddende slam fjernes. Nedsænk derefter krukkerne i en fortyndet opløsning af natriumhypochlorit og dernæst i vand, og afskyl dem til sidst omhyggeligt i vand.

22. Der kræves særlige teknikker til beluftning af slammet i beluftningstankene i begge systemer, f.eks. sintrede klodser (diffusionssten) og trykluft. Luften skal renses, eventuelt ved at passere et særligt filter, og skylles. En passende luftmængde skal passere gennem systemet for at opretholde de aerobe betingelser og for at holde slammet konstant i suspension i løbet af testen.

Filtreringsapparat eller centrifuge

23. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 μm) til adsorption af opløselige organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 m/s^2.

Analyseudstyr

24. Apparatur, der bruges til bestemmelse af:

— DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof) eller COD (kemisk iltforbrug)

— specifikt kemikalie, hvis påkrævet

— suspenderede stoffer, pH, iltkoncentration i vand

— temperatur, syreindhold og alkalinitet

— ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold.

Vand

25. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC. Bestem alkalinitet, hvis den ikke allerede er kendt.

26. Deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

Organisk materiale

27. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist (11) (14), at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent og endda eliminering og bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Endelig stabiliserer konstant eller intermitterende tilsætning af husholdningsspildevand ofte det aktiverede slam og dermed den vigtige evne til effektiv bundfældelse. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC eller COD i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumdihydrogenfosfat), hvis materialets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. 7,5 ± 0,5 i beluftningstanken under udførelsen af testen. Mængden af buffer, der skal tilsættes, og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde. Når blandinger benyttes enten kontinuerligt eller intermitterende, skal DOC (eller COD) i blandingen holdes på et nogenlunde konstant niveau, f.eks. ved hjælp af fortynding med vand.

▼M4

Syntetisk spildevand

28. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Hvis der kræves et knapt så koncentreret indløb, kan det syntetiske spildevand fortyndes (f.eks. 1:1) med ledningsvand for at opnå en koncentration på ca. 50 mg/l. Et sådant svagere indløb vil give mulighed for en bedre vækst af nitrificerende organismer, og denne modifikation bør anvendes, hvis simuleringen af nitrificerende spildevandsplanter skal undersøges. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

Husholdningsspildevand

29. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsagelig modtager husholdningsspildevand. Spildevandet indsamles før den primære sedimentering fra overløbskanalen ved den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring (normalt dog højst syv dage) ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

Aktiveret slam

30. Aktiveret slam til inokulering indsamles fra beluftningstanken i et velfungerende spildevandsanlæg eller fra en aktiveret slamenhed i laboratorieskala, der hovedsagelig behandler husholdningsspildevand.

Stamopløsninger af testkemikaliet

31. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Oplysninger om uopløselige og flygtige kemikalier findes i tillæg 5. Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliets vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle værdi for at fastslå, hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.

▼M4

32. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på 7 ± 0,5. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

FREMGANGSMÅDE

33. Fremgangsmåden er beskrevet for aktiverede slamanlæg. Den skal tilpasses på enkelte områder til brug i systemet med porøse krukker.

Fremstilling af inokulum

34. Ved begyndelsen af testen podes testsystemet med aktiveret slam eller med et inokulum, der indeholder en lav koncentration af mikroorganismer. Hold inokulum beluftet ved stuetemperatur, indtil det er opbrugt, og brug det inden for 24 timer. I det første tilfælde udtages en prøve af aktiveret slam fra beluftningstanken i et effektivt drevet biologisk spildevandsrensningsanlæg eller et laboratorierensningsanlæg, der primært modtager husholdningsspildevand. Hvis nitrificerende forhold skal simuleres, udtages slam fra et nitrificerende spildevandsrensningsanlæg. Bestem koncentrationen af suspenderede stoffer, og koncentrer om nødvendigt slammet ved bundfældning, så testsystemet tilføres et minimalt volumen. Sørg for, at udgangskoncentrationen af faststof er ca. 2,5 g/l.

35. I det andet tilfælde anvendes 2-10 ml/l udløb fra et biologisk anlæg til rensning af husholdningsspildevand som inokulum. For at få så mange forskellige bakteriearter som muligt kan det være nyttigt at tilføje inokula fra forskellige andre kilder, f.eks. overfladevand. I så fald vil det aktiverede slam udvikle sig og vokse i testsystemet.

Dosering af organisk materiale

36. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen. Testsystemerne samles på et sted, hvor temperaturen er kontrolleret (normalt inden for 20-25 °C). Hvis det ikke er muligt, benyttes testanlæg med vandkappe. Fremstil en tilstrækkelig mængde af det krævede organiske materiale (afsnit 27-29). Fyld først beluftningstank og separator med det organiske materiale, og tilsæt inokulum (afsnit 34 og 35). Start beluftningen, så slammet holdes opslæmmet og i aerob tilstand, og påbegynd dosering af indløb og genanvendelse af det bundfældede slam. Hæld organisk materiale fra opbevaringstankene over i beluftningstankene (afsnit 20 og 21) i test- og kontrolenhederne, og opsaml de respektive udløb i tilsvarende opbevaringstanke. For at opnå den normale hydrauliske retentionstid på seks timer pumpes det organiske materiale ved 0,5 l/h. Denne hastighed bekræftes ved at måle den daglige mængde organisk materiale og registrere reduktionen i volumen af materialet i opbevaringstankene. Andre doseringsmetoder anvendes, hvis virkningen af intermitterende frigivelse og »chok«-tilsætning af kemikalier skal bestemmes.

37. Hvis det organiske materiale er fremstillet til brug i en periode længere end én dag, skal det nedkøles til ca. 4 °C eller konserveres på anden måde for at forhindre mikrobiel vækst og bionedbrydning uden for testenhederne (afsnit 29). Hvis der benyttes syntetisk spildevand, kan en koncentreret stamopløsning fremstilles og opbevares ved ca. 4 °C (f.eks. 10 gange den normale koncentration, afsnit 28). Denne stamopløsning kan omhyggeligt opblandes med den korrekte mængde ledningsvand inden brug. Den kan også tilføres direkte, mens den korrekte mængde ledningsvand tilføres separat.

▼M4

Dosering af testkemikalie

38. Tilsæt den korrekte mængde stamopløsning af testkemikaliet (afsnit 31) til opbevaringstanken med indløb, pump det direkte med en separat pumpe over i beluftningstanken. Den normale gennemsnitlige testkoncentration i indløbet bør være mellem 10 mg/l og 20 mg/l DOC med en højeste koncentration på maks. 50 mg/l. Hvis vandopløseligheden af testkemikaliet er lav, eller hvis der er sandsynlighed for, at der vil opstå toksiske virkninger, skal koncentrationen reduceres til 5 mg/l DOC eller mindre, men kun hvis der benyttes en relevant specifik analysemetode (dispergerede testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan tilsættes ved hjælp af særlige tilsætningsteknikker, se tillæg 5).

39. Begynd at tilsætte testkemikaliet efter en periode, hvor systemet har stabiliseret sig og effektivt reducerer DOC i det organiske materiale (ca. 80 %). Det er vigtigt at kontrollere, at alle enheder fungerer lige effektivt, inden testkemikaliet tilsættes. Hvis de ikke gør det, hjælper det normalt at blande de enkelte slamportioner og derefter fordele slammet i lige store portioner til de enkelte enheder. Når et inokulum af (ca.) 2,5 g/l (tørvægt) aktiveret slam er brugt, kan testkemikaliet tilsættes fra begyndelsen af testen, idet direkte tilsætning af stigende mængder fra begyndelsen har den fordel, at det aktiverede slam bedre kan tilpasse sig testkemikaliet. Uanset hvordan testkemikaliet tilsættes, bør gennemstrømningshastigheden og/eller volumen i opbevaringstankene måles med regelmæssige intervaller.

Håndtering af aktiveret slam

40. I løbet af testen stabiliserer koncentrationen af faststofferne i aktiveret slam sig normalt mellem grænseværdier, uanset det anvendte inokulum, i intervallet mellem 1 og 3 g/l (tørvægt) afhængigt af kvalitet og koncentration af det organiske materiale, driftsbetingelser, de anvendte mikroorganismers fysiske tilstand og påvirkningen fra testkemikaliet.

41. Bestem enten de suspenderede stoffer i beluftningstankene bestemmes mindst én gang om ugen, og bortskaf det overskydende slam for at holde koncentrationen på 1 g/l til 3 g/l (tørvægt), eller kontroller den gennemsnitlige slamalder ved en konstant værdi, normalt inden for intervallet 6 til 10 dage. Hvis der f.eks. er valgt en slamretentionstid på otte dage, skal der dagligt fjernes og bortskaffes 1/8 af det aktiverede slams volumen i beluftningstanken. Dette skal udføres dagligt eller fortrinsvis ved hjælp af en automatisk intervaldrevet pumpe. Selv om koncentrationen af suspenderede stoffer holdes konstant eller inden for et snævert interval, opnås der ikke en konstant slamretentionstid (SRT), som er den driftsvariabel, der bestemmer værdien af koncentrationen af testkemikaliet i udløbet.

42. I løbet af hele testen skal slam, der sidder på væggene i beluftningstank og separator, fjernes, så det igen suspenderes. Kontroller og rengør regelmæssigt alle rør og slanger for at forhindre dannelsen af biofilm. Recirkuler det bundfældede slam fra separatoren til beluftningstanken, helst ved hjælp af intermitterende pumpning. Der sker ingen recirkulation i systemet med porøse krukker. Det skal dog kontrolleres, at der er indsat rene indvendige krukker, inden volumen i tanken stiger væsentligt (afsnit 21).

43. Der kan forekomme dårlig bundfældning og tab af slam i Husmann-enhederne. Dette kan afhjælpes ved samtidig at udføre en eller flere af de handlinger, der er anført nedenfor, i test- og kontrolenheder:

— Frisk slam eller flokkuleringsmiddel (f.eks. 2 ml/krukke på 50 g/l $FeCl_3$) tilsættes med regelmæssige mellemrum, f.eks. hver uge. Det skal dog kontrolleres, at der ikke sker nogen reaktion eller udfældning af testkemikaliet med $FeCl_3$.

▼M4

— Trykluftpumpen kan erstattes med en slangepumpe, således at slam kan recirkuleres i en strøm, der omtrentligt svarer til den krævede indløbsstrøm, og således at der kan dannes en anaerob zone i det bundfældede slam (trykluftpumpens geometri begrænser minimumsgennemstrømningen af returslam til ca. det 12-dobbelte af indløbets).

— Slammet kan intermitterende pumpes fra separatoren til beluftningstanken, f.eks. 5 minutter hver 2,5 time for at recirkulere 1-1,5 l/h.

— Et ikke-toksisk skumdæmpningsmiddel i mindste koncentration kan bruges til at forhindre tab som følge af skumdannelse (f.eks. silikoneolie).

— Luft kan presses gennem slammet i separatoren i korte chokbølger (f.eks. 10 sekunder hver time).

— Det organiske materiale kan tilsættes beluftningstanken med bestemte intervaller (f.eks. 3-10 minutter hver time).

Kontrol og analyse

44. Med regelmæssige mellemrum måles den opløste iltkoncentration, temperaturen og pH-værdien af det aktiverede slam i beluftningstankene. Sørg for, at der altid er tilstrækkeligt ilt til stede (> 2 mg/l), og at temperaturen holdes inden for det krævede interval (normalt 20-25 °C). Hold pH på 7,5 ± 0,5 ved at tilsætte små mængder uorganisk base eller syre til beluftningstanken eller til indløbet eller ved at øge det organiske materiales bufferkapacitet (se afsnit 27). I forbindelse med nitrifikation udvikles syre. Oxidering af 1 mg N producerer en mængde, der svarer til ca. 7 mg CO_3^-. Målefrekvensen afhænger af den parameter, der skal måles, og af systemets stabilitet og kan variere mellem daglige og ugentlige målinger.

45. Måling af DOC eller COD i indløb til kontrol- og testbeholdere. Koncentrationen af testkemikalie i testindløbet måles ved hjælp af specifik analyse, eller den anslås ud fra koncentrationen i stamopløsningen (afsnit 31), den anvendte mængde og mængden af spildevand, der tilføres testenheden. Det anbefales, at koncentrationen af testkemikaliet beregnes for at reducere variabiliteten i koncentrationsdata.

46. Der udtages relevante prøver fra det indsamlede udløb (f.eks. sammensatte prøver over 24 timer), og de filtreres gennem en membran med em porestørrelse på 0,45 µm. De kan også centrifugeres ved ca. 40 000 m/s^2 i ca. 15 minutter. Centrifugering bør benyttes, hvis filtrering er besværlig. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC eller COD for at måle den ultimative bionedbrydning og evt. den primære bionedbrydning ved hjælp af en analyse, der er specifik for testkemikaliet.

47. Anvendelsen af COD kan medføre analyseproblemer ved lave koncentrationer og anbefales derfor kun, hvis der benyttes en tilstrækkelig høj testkoncentration (ca. 30 mg/l). Ved kraftigt adsorberende kemikalier anbefales det ligeledes, at mængden af adsorberet kemikalie i slammet måles ved hjælp af en analyseteknik, der er specifik for testkemikaliet.

48. Hyppigheden af prøvetagning afhænger af testens forventede varighed. En anbefalet hyppighed er tre gange pr. uge. Når enhederne kører effektivt, kan der gå fra en uge til højst seks uger efter tilsætning af testkemikaliet, inden tilpasningsfasen har nået et stabilt niveau (steady state). Der indsamles mindst 15 gyldige værdier i plateaufasen (afsnit 59), som normalt varer tre uger, inden testresultatet evalueres. Testen kan gennemføres, hvis der opnås en tilstrækkelig elimineringsgrad (f.eks. > 90 %), og disse 15 værdier, som repræsenterer analyser, der er udført hver arbejdsdag i tre uger, er tilgængelige. Testvarigheden bør normalt ikke overstige 12 uger efter tilsætning af testkemikaliet.

▼M4

49. Hvis slammet nitrificerer, og hvis testkemikaliets indvirkning på nitrificeringen skal undersøges, analyseres prøverne fra test- og kontrolenhedernes udløb mindst én gang om ugen, for så vidt angår ammoniak og/eller nitrit samt nitrat.

50. Alle analyser gennemføres så hurtigt som muligt, især målinger af nitrogen. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4 °C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring (f.eks. 10 ml/l af en opløsning på 400 g/l af svovlsyre) eller tilsætning af et hensigtsmæssigt toksisk stof (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l-opløsning af kviksølv (II)-chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

Kobling af testenheder

51. Hvis kobling (tillæg 3) anvendes, skal der dagligt udveksles den samme mængde aktiveret slam (150-1 500 ml for beluftningstanke med 3 l væske) mellem testenhedens beluftningstank og kontrolenhedens beluftningstank. Hvis testkemikaliet adsorberer kraftigt til slammet, er det kun separatorernes svømmelag, der skal skiftes. I begge tilfælde skal der benyttes en korrektionsfaktor for at beregne testresultaterne (afsnit 55).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

52. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikaliet for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

hvor

D_t = % eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

C_s = DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikaliet, fortrinsvis anslået ud fra stamopløsningen (mg/l)

E = målt DOC- eller COD-værdi i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

E_o = målt DOC- eller COD-værdi i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l)

53. Graden af DOC- eller COD-eliminering af det organiske materiale i kontrolenheden er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af det aktiverede slam i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

hvor

D_B = % eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden på tidspunktet t

C_M = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløbet (mg/l)

▼M4

Beregn evt. den procentvise eliminering af DOC eller COD fremkaldt af det organiske materiale plus testkemikaliet i testenheden ved hjælp af ligningen:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

hvor

D_T = % eliminering af DOC eller COD i samlet testindløb

C_T = DOC eller COD af samlet testindløb eller beregnet ud fra stamopløsning (mg/l)

54. Beregn elimineringen af testkemikaliet målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

hvor

D_{ST} = % primær eliminering af testkemikalie på tidspunktet t

S_i = målt eller estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

S_e = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

55. Hvis der er benyttet koblet tilstand, skal der kompenseres for fortyndingen af testkemikaliet i beluftningstanken som følge af slamudskiftning ved hjælp af en korrektionsfaktor (se tillæg 3). Hvis der er benyttet en gennemsnitlig hydraulisk retentionstid på seks timer, og halvdelen af volumenet af det aktiverede slam er udskiftet i beluftningstanken, skal de fastsatte daglige elimineringsværdier (D_t, afsnit 52) korrigeres for at opnå en korrekt elimineringsgrad, D_{tc}, af testkemikaliet ved hjælp af ligningen:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Angivelse af testresultater

56. Indtegn den procentvise eliminering D_t (eller D_{tc}) og eventuelt D_{st} i forhold til tiden (se tillæg 2). Ud fra formen på testkemikaliets elimineringskurve (i sig selv eller som DOC) kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocessen.

Adsorption

57. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikaliet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikaliet sandsynligvis ved adsorption til de aktiverede faststoffer i slam. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie ved hjælp af specifikke analyser. Sædvanligvis forbliver DOC-elimineringen af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie på en eller anden måde kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikaliet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

▼M4

Lag-fase

58. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de nedbrydende bakterier næsten uden eliminering af testkemikaliet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen indledes, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

Plateaufase

59. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Plateaufasen bør vare mindst tre uger og have ca. 15 målte gyldige værdier.

Middelelimineringsgrad for testkemikalie

60. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne (D_t) for testkemikaliet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver den graden af eliminering af testkemikaliet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien.

Eliminering af organisk materiale

61. Indtegn procentdelen af eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden (D_B) i forhold til tiden. Angiv middelgraden af eliminering på samme måde som for testkemikaliet (afsnit 60).

Indikation for bionedbrydning

62. Hvis testkemikaliet ikke tydeligt adsorberes til det aktiverede slam, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 58 og 59), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripning), skal de adsorberede testkemikalier analyseres, eller yderligere statiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indicerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse [kapitel C.4 D, E og F i dette bilag (6)], test med måling af kuldioxidproduktion [kapitel C.4 C i dette bilag (6)] eller ISO Headspace-metoden (18), der benytter et præeksponeret inokulum fra simuleringstesten. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikaliet er målt, indicerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

Testresultaternes validitet

63. Oplysninger om den normale biologiske nedbrydningsproces af inokulum fås, når elimineringsgraden af det organiske materiale (afsnit 53) i kontrolenheden fastlægges. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering i kontrolenhederne er > 80 % efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.

▼M4

64. Hvis der er benyttet et let biologisk nedbrydeligt kemikalie (reference), bør graden af bionedbrydning (D_t, afsnit 52) være > 90 %.

65. Hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold, bør middelkoncentrationen i udløb være < 1 mg/l ammoniak-N og < 2 mg/l nitrit-N.

66. Hvis disse kriterier (afsnit 63-65) ikke opfyldes, gentages testen ved hjælp af et inokulum fra en anden kilde, hvorefter et referencekemikalie testes, og alle forsøgsprocedurer kontrolleres.

Testrapport

67. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

— identifikationsdata

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

Testbetingelser:

— typen af testsystem; evt. modificeringer for test af uopløselige og flygtige kemikalier

— typen af organisk materiale

— art og andel af industrispildevand i spildevandet, hvis kendt

— inokulum, art og prøvetagningssted(er), koncentration og evt. forkonditionering

— stamopløsning af testkemikalie: DOC- og TOC-indhold; tilberedning i tilfælde af suspension; anvendt testkoncentration; årsager, hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; evt. ændringer

— gennemsnitlig slamalder og gennemsnitlig hydraulisk retentionstid, slamoverløbsmetode, metoder til afhjælpning af fyldning, tab af slam osv.

— anvendte analyseteknikker

— testtemperatur

— kvaliteter af slamfyld, slamvolumenindeks (SVI), faste stoffer, der er suspenderet (MLSS)

— enhver afvigelse fra standardprocedurer og alle omstændigheder, der kan have påvirket resultaterne.

Testresultater:

— alle målte data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur, iltkoncentration, suspenderede stoffer og N-kemikalier, hvis det er relevant)

— alle beregnede værdier af D_t (eller D_{tc}), D_B og D_{St} opstillet i tabelform og elimineringskurver

— oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikaliet og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet

— diskussion af resultater.

▼**M4**

LITTERATUR:

(1) Swisher RD (1987). »Surfactant Biodegradation«, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 s.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA og King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Det Forenede Kongerige.

(4) Painter HA og King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(7) Kapitel C.12 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — modificeret SCAS-test.

(8) Kapitel C.19 i dette bilag, Bestemmelse af adsorptionskoefficienten (K_{OC}) i jord og i kloakslam med HPLC (high performance liquid chromatography).

(9) Gerike P og Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P og Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA og Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s 113-138, i: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revideret 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium — activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK og Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G og Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

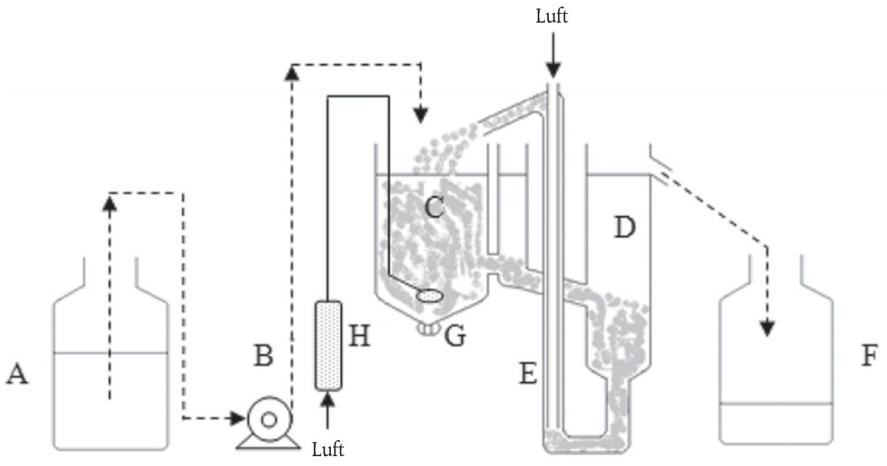
▼**M4**

Tillæg 1

Figur 1

Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed

Husmann-enhed



A. Opbevaringstank

B. Doseringspumpe

C. Beluftningskammer (kapacitet: 3 l)

D. Sedimentationsbeholder

E. Trykluftpumpe

F. Opsamlingstank

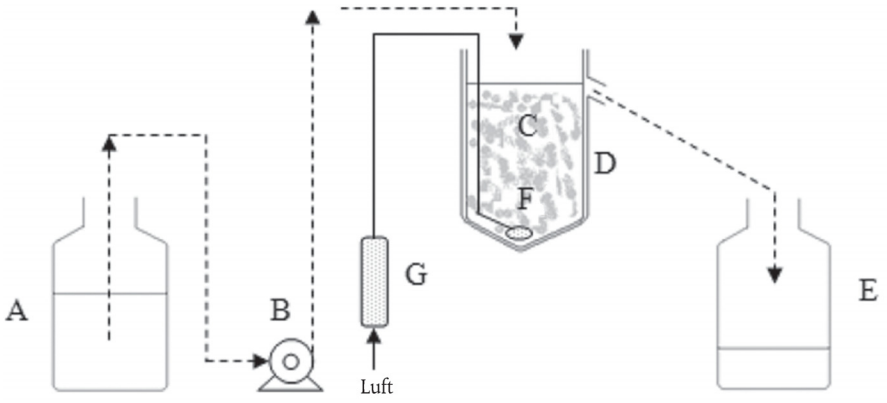
G. Beluftningsanordning

H. Flowmeter

Figur 2

Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed

Porøse krukker



A. Opbevaringstank

B. Doseringspumpe

C. Porøs beluftningstank

D. Ydre tæt beholder

E. Opsamlingstank

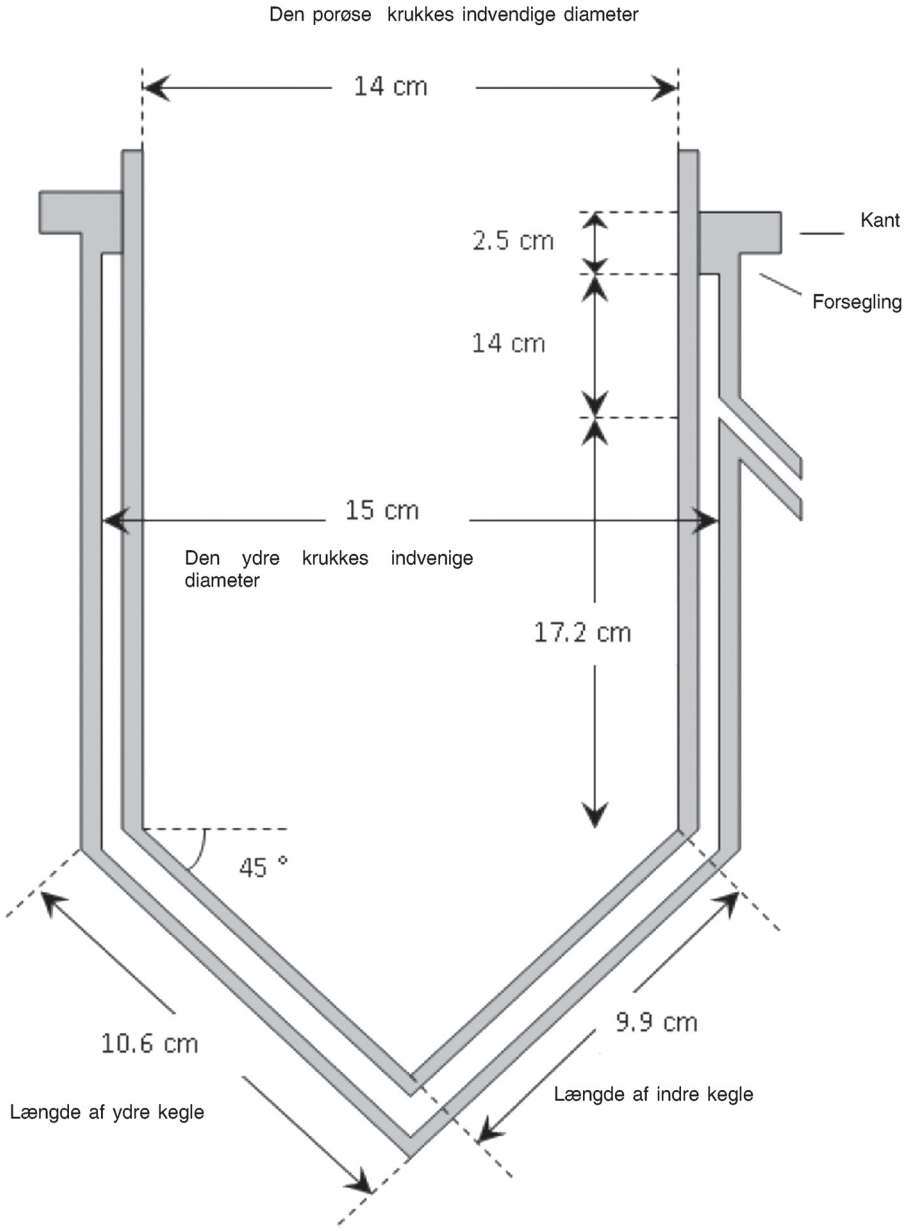
F. Diffuser

G. Flowmeter

▼M4

Figur 3

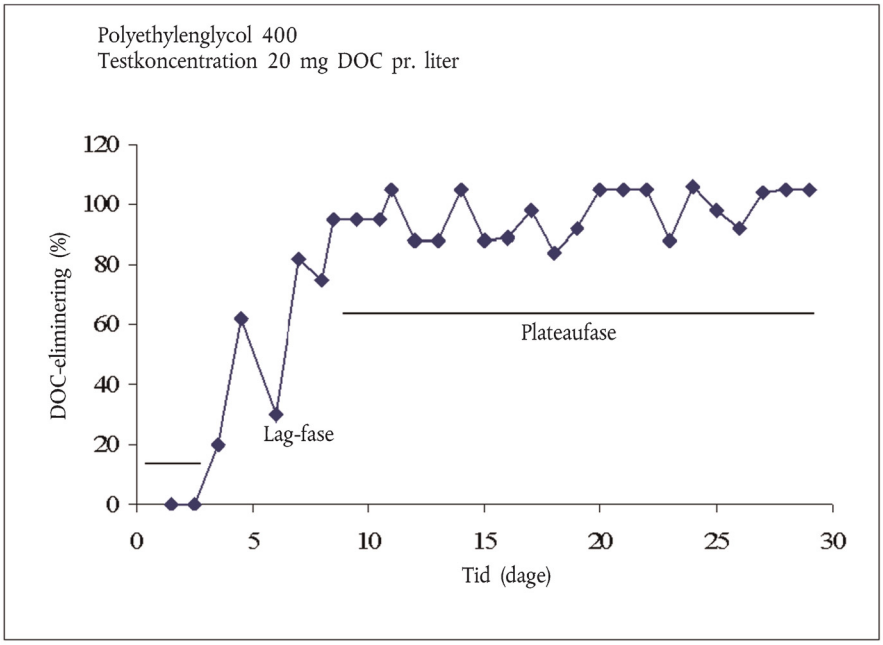
Porøs krukke som beluftningstank – 3 l



▼**M4**

Tillæg 2

Eksempel på en elimineringskurve



▼M4

Tillæg 3

[TIL ORIENTERING]

KOBLING AF TESTENHEDER

For at forsøge at udligne de mikrobielle populationer i slam i en testenhed, der tilføres spildevand og et testkemikalie, og i en kontrolenhed, der kun tilføres spildevand, blev der indført en daglig udskiftning af slam (1). Proceduren kaldes kobling, og metoden er kendt som koblede enheder. Kobling blev i starten udført ved hjælp af aktiverede slamenheder (Husmann), men det anvendes også i forbindelse med porøse krukker (2) (3). Der er ikke konstateret væsentlige forskelle i resultaterne mellem ikke-koblede og koblede enheder, hverken med Husmann-enheder eller porøse krukker, så der opnås ingen fordel ved at bruge tid og energi på at koble enhederne.

Udveksling af slam kan give indtryk af en ret omfattende eliminering, idet nogle af testkemikalierne overføres, og koncentrationerne af testkemikaliet i test- og kontroludløbet bliver næsten ens. Der skal derfor anvendes korrektionsfaktorer, som afhænger af den andel, der udskiftes, og den hydrauliske middelretentionstid. Der er offentliggjort nærmere oplysninger om beregningen (1).

Beregn den korrigerede DOC- eller COD-elimineringsgrad ved hjælp af den generelle formel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

hvor

D_{tc} = korrigeret % DOC- eller COD-eliminering

D_t = konstateret % DOC- eller COD-eliminering

a = udskiftningens andel af de aktiverede slamenheders volumen

r = gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (t)

Eksempel: Hvis halvdelen af beluftningstankens volumen udskiftes (a = 0,5), og den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid er seks timer, anvendes følgende korrigerende formel:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITTERATUR

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA og Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113-138. I: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Det Forenede Kongerige.

▼M4

Tillæg 4

EVALUERING AF HÆMNINGEN AF DET AKTIVEREDE SLAM

Proces med testkemikalier

1. Visse kemikalier (eller spildevand) bliver muligvis ikke nedbrudt eller elimineret i simuleringstesten, og de kan endog have en hæmmende effekt på slammets mikroorganismer. Andre kemikalier nedbrydes biologisk ved lave koncentrationer, men er hæmmende ved højere koncentrationer (hormese). Der kan være påvist hæmmende effekter på et tidligere stadium, eller det kan være bestemt ved hjælp af en toksicitetstest, hvor der er anvendt et inokulum, der svarer til eller er identisk med det, der blev anvendt i simuleringstesten (1). Eksempler på sådanne metoder er hæmning af iltoptagelse [kapitel C.11 i dette bilag (2) og ISO 8192(3)] eller hæmning af vækst af slamorganismer [ISO 15522 (4)].

2. I simuleringstesten vil enhver hæmning vise sig ved, at forskellen i opløst organisk kulstof (DOC) eller kemisk iltforbrug (COD) mellem udløbet fra testbeholderen og udløbet fra kontrollen er større end det DOC, der er tilsat som testkemikalie. Udtrykt på en anden måde vil den procentvise eliminering af DOC (og det biokemiske iltforbrug (BOD), COD og/eller NH^{+}_{4}) af det organiske materiale blive reduceret ved behandling i kraft af tilstedeværelsen af testkemikaliet. Hvis det sker, gentages testen, hvor koncentrationen af testkemikaliet reduceres, indtil der nås et niveau, hvor der ikke sker nogen hæmning, og måske reduceres yderligere, indtil testkemikaliet er biologisk nedbrudt. Hvis testkemikaliet (eller spildevandet) imidlertid har negative virkninger på processen ved alle testede koncentrationer, tyder det på, at kemikaliet er svært og muligvis umuligt at behandle biologisk. Det er dog værd at gentage testen med aktiveret slam fra en anden kilde og/eller underkaste slammet en langsommere akklimatisering.

3. Hvis testkemikaliet omvendt elimineres biologisk i første forsøg i simuleringstesten, skal koncentrationen forøges, hvis der skal indsamles viden om, hvorvidt kemikaliet kan være hæmmende.

4. Når man forsøger at bestemme grader af hæmning, skal man være opmærksom, at den aktiverede slampopulation kan undergå forandringer, så mikroorganismerne over tid kan udvikle en tolerance over for et hæmmende kemikalie.

5. Beregning af hæmningsgrad:

   Den overordnede procentvise eliminering R_o, af BOD, DOC, COD osv., kan for test- og kontrolenheder beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

   hvor:

   I = indløbets koncentration af BOD, DOC, COD mv. i forbindelse med test- eller kontrolbeholdere (mg/l)

   E = udløbets koncentrationer (mg/l).

   I og E skal korrigeres for DOC, der skyldes testkemikaliet i testenhederne. Ellers vil beregningerne af den procentvise hæmning ikke blive korrekt.

▼**M4**

Graden af hæmning forårsaget af tilstedeværelsen af testkemikaliet kan beregnes ved hjælp af ligningen:

$$\% \text{ hæmning} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

hvor:

R_c = procentvis eliminering i kontrolbeholderne

R_t = procentvis eliminering i testbeholderne.

LITTERATUR

(1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Tillæg 5

Testkemikalier, der er tungtopløselige i vand — flygtige kemikalier

Kemikalier, der er tungtopløselige i vand

Der er tilsyneladende kun offentliggjort enkelte rapporter om test af vandopløselige og uopløselige kemikalier i forbindelse med spildevandsrensning (1) (2) (3).

Der findes ingen enkeltstående metode til dispergering af testkemikalier, der kan benyttes på alle uopløselige kemikalier. To af de fire metodetyper, der er beskrevet i ISO 10634 (4), kan muligvis bruges til at dispergere testkemikalier med henblik på simuleringstest. Det drejer sig om brug af emulgeringsmidler og/eller ultralyd. Det skal godtgøres, at den resulterende dispergering er stabil i perioder på mindst 24 timer. Velstabiliserede dispergeringer, der etableres under konstant omrøring i en beholder (afsnit 38), skal derefter overføres til en beluftningstank, der holdes adskilt fra husholdningsspildevand (eller syntetisk spildevand).

Hvis dispergeringerne er stabile, undersøges det, hvordan testkemikaliet kan bestemmes i dispergeret form. Det er ikke sandsynligt, at DOC vil være velegnet. Der skal derfor etableres en specifik analysemetode for testkemikaliet, som kan anvendes på udløb, faststoffer i udløb og aktiveret slam. Testkemikaliets skæbne i simuleringen af processen for aktiveret slam bestemmes derefter i flydende og faste faser. Derefter fastsættes en »massebalance« med henblik på at afgøre, om testkemikaliet er blevet biologisk nedbrudt. Det indicerer dog kun den primære biologiske nedbrydning. Påvisning af ultimativ biologisk nedbrydning sker ved at anvende af en respirometertest for let biologisk nedbrydelighed (kapitel C.4 i dette bilag (5) C, F eller D), hvor inokulumslam eksponeres for testkemikaliet i simuleringstesten.

Flygtige kemikalier

Udførelsen af simuleringer af spildevandsrensning på flygtige kemikalier er både kontroversiel og problematisk. Ligesom for testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, er der offentliggjort meget få rapporter, der beskriver simuleringstest af flygtige kemikalier. En konventionel type apparatur til fuldstændig opblanding tilpasses ved at forsegle beluftnings- og sedimentationstankene, måle og styre luftstrømmen ved hjælp af flowmetre og lede den udgangsgas gennem udskillere med henblik på at indsamle flygtigt organisk materiale. I nogle tilfælde benyttes en vakuumpumpe til at suge udgangsgassen gennem en »kold« udskiller eller en udsugningsudskiller med Tenax og silicagel med henblik på gaskromatografiske analyser. Testkemikaliet i udskilleren kan bestemmes analytisk.

Testen udføres i to etaper. Først kører enhederne uden slam, men hvor syntetisk spildevand og testkemikaliet pumpes ind i beluftningstanken. Prøver fra indløb, udløb og udgangsgas indsamles og analyseres for testkemikaliet i et par dage. Ud fra de indsamlede data kan den procentdel (R_{vs}) af testkemikaliet, der strippes fra systemet, beregnes.

Derefter gennemføres den normale biologiske test (med slam) under samme driftsbetingelser som stripningsundersøgelsen. Der udføres ligeledes DOC- eller COD-målinger for at kontrollere, at enhederne fungerer effektivt. Der udføres lejlighedsvise analyser for at bestemme testkemikaliet i indløb, udløb og udgangsgas i den første del af testen. Efter akklimatisering gennemføres hyppigere analyser. Ud fra steady state-data beregnes procentdelen af den eliminering af testkemikaliet fra væskefasen, der sker som følge af alle processer (R_T) (fysisk og biologisk), og andelen af (R_V), der er strippes fra systemet.

▼**M4**

Beregning:

a) I den ikke-biologiske test beregnes procentdelen (R_{VP}) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

hvor

R_{VP} = eliminering af testkemikalie ved fordampning (%)

S_{VP} = testkemikalie opsamlet i udskiller udtrykt som tilsvarende koncentration i væskefasen (mg/l)

S_{IP} = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

b) I den biologiske test beregnes procentdelen (R_V) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

hvor

R_V = eliminering af testkemikalie ved fordampning i biologisk test (%)

S_V = testkemikalie opsamlet i udskiller i biologisk test udtrykt som tilsvarende koncentration i det flydende indløb (mg/l)

S_I = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

c) I den biologiske test beregnes den procentdel (R_T) af testkemikaliet, der fjernes af alle processer, ved hjælp af ligningen:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

hvor

S_E = koncentration af testkemikalie i det (flydende) udløb (mg/l).

d) Den procentdel (R_{BA}), der fjernes ved bionedbrydning plus adsorption, beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Der udføres separate test for at bestemme, om testkemikaliet er adsorberet. Hvis det er tilfældet, skal der foretages yderligere korrektion.

e) En sammenligning mellem den andel af testkemikalie, der strippes fra de biologiske (R_v) og de ikke-biologiske testsystemer (R_{vp}), viser den generelle virkning, som biologisk behandling har på emissionen af testkemikaliet i atmosfæren.

Eksempel: Benzen

Slamretentionstid = 4 dage

Syntetisk spildevand: retentionstid = 8 timer

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Således …

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % og R_{BA} = 85 %.

Benzen anses derfor ikke til at blive adsorberet til slam.

LITTERATUR

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

▼M4

Tillæg 6

Virkninger af slamretentionstid (SRT) på mulighederne for at behandle kemikalier

INDLEDNING

1. Den metode, der beskrives i selve teksten, har til formål at afdække, om de testede kemikalier (normalt kemikalier, der er inhærent biologisk nedbrydelige, men ikke let biologisk nedbrydelige) kan nedbrydes biologisk inden for de rammer, der eksisterer i større spildevandsanlæg. Resultaterne udtrykkes som procentvis eliminering og procentvis bionedbrydning. Driftsforholdene i aktivslamenhederne og valget af indløb giver mulighed for temmelig store variationer i koncentrationen af testkemikaliet i udløbet. Testene udføres ved kun én nominel koncentration af slamfaststoffer eller én nominel slamretentionstid (SRT), og de beskrevne slamoverløbssystemer kan bevirke, at SRT-værdien varierer betydeligt i løbet af testen, både fra dag til dag og i løbet af dagen.

2. I denne variant (1) (2) holdes SRT inden for meget snævrere grænser i løbet af hver periode på 24 timer (på samme måde som i stort forhold), hvilket fører til en mere konstant koncentration i udløb. Det anbefales at bruge husholdningsspildevand, idet det giver mere konsistente og højere procentvis eliminering. Virkningerne af en række SRT-værdier undersøges, og i en mere detaljeret undersøgelse kan virkningerne af forskellige temperaturintervaller på forskellige udløbs koncentration bestemmes.

3. Der er endnu ikke generel enighed om de anvendelige kinetiske modeller, når kemikalier bionedbrydes i forbindelse med spildevandsrensning. Monod-modellen for bakteriel vækst og substratudnyttelse blev valgt (1) (2) til brug på de indsamlede data, idet metoden var beregnet til kun at blive brugt på kemikalier, der var produceret i store mængder, og som resulterede i spildevandskoncentrationer over 1 mg/l. Validiteten af den forenklede model og de angivne beregninger blev bekræftet ved hjælp af en serie alkoholethoxylater med varierende grader af primær bionedbrydelighed (2) (3).

Bemærk: Denne variantmetode ligger tæt op ad teksten til denne testmetode C.10-A, og det er kun de afvigende oplysninger, der herefter angives.

TESTENS PRINCIP

4. Enheder med porøse krukker til aktiveret slam, som er beregnet til at lette (næsten) kontinuerligt overløb af blandet væske, således at slamretentionstiden (SRT eller θ_s) kan styres meget præcist, anvendes i ikke-koblet tilstand over et interval af SRT'er og evt. et interval af temperaturer. Retentionstiden er normalt 2-10 dage, og temperaturen ligger mellem 5 og 20 °C. Spildevandet, helst husholdningsspildevand, tilsættes sammen med en opløsning af testkemikaliet separat til enhederne i intervaller for at opnå den krævede retentionstid for spildevandet (3-6 timer) og den krævede koncentration af testkemikaliet i indløbet. Kontrolenheder, der ikke tilføres testkemikalier, kører parallelt med henblik på sammenligning.

5. Andre former for apparatur kan benyttes, men der skal udvises stor omhu for at opnå effektiv styring af SRT. Hvis der anvendes anlæg, som omfatter en sedimenteringsenhed, skal der f.eks. tages højde for tab af faststoffer via anlæggets udløb. Endelig skal der også tages særlige forholdsregler for at undgå fejl forårsaget af variationer i mængden af slam i sedimenteringsenheden.

▼M4

6. Enhederne drives ved hvert af de valgte sæt betingelser. Når ligevægtstilstanden er nået, opnås de gennemsnitlige steady state-koncentrationer af testkemikaliet i udløbet og evt. DOC i løbet af en periode på ca. tre uger. Ud over at vurdere den procentvise eliminering af testkemikaliet og evt. DOC udtrykkes forholdet mellem driftsforholdene i et anlæg og koncentrationen i udløbet grafisk. På den baggrund kan tentative kinetiske konstanter beregnes, og de betingelser, hvorunder testkemikaliet kan behandles, kan forudsiges.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Kapitel C.10 A, afsnit 12 og 13, finder anvendelse.

TÆRSKELVÆRDIER

8. Kapitel C.10 A, afsnit 14 og 15, finder anvendelse.

REFERENCETESTKEMIKALIE

9. Kapitel C.10 A, afsnit 16, finder anvendelse.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. Kapitel C.10 A, afsnit 17 og 18, finder anvendelse.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

11. En velegnet enhed er det modificerede system med porøse krukker (tillæg 6.1). Det består af en indvendig beholder (eller foring) fremstillet af porøst polypropylen med en tykkelse på 3,2 mm og en porestørrelse på ca. 90 μm. Samlingen er stumpsvejset. (Det giver en mere robust enhed end den, der er beskrevet i afsnit 21 i dette kapitel, C.10 A.) Foringen er indsat i en tæt ydre beholder af polyethylen, der består af to dele: en cirkelrund fod, hvori der er boret huller til to luftslanger og en slange til slamoverløb, samt en påmonteret cylinder, der skrues fast på foden, og som er forsynet med et udløb, der er placeret, så der opnås et bestemt volumen (3 l) i den porøse krukke. En af luftslangerne er udstyret med en diffuser-sten, og den anden afslutter åbent og er placeret vinkelret på stenen i krukken. Dette system frembringer turbulens, der sikrer, at krukkens indhold blandes effektivt, og at der opnås koncentrationer af opløst ilt over 2 mg/l.

12. Et passende antal enheder opbevares ved kontrollerede temperaturer i intervallet fra 5-20 °C (± 1 °C) enten i vandbad eller i lokaler med konstant rumtemperatur. Ved hjælp af pumper tilføres opløsningen af testkemikaliet og bundfældet spildevand til beluftningstankene i de angivne doser (0-1,0 ml/min. og 0-25 ml/min.), og ved hjælp af en tredje pumpe fjernes affaldsslam fra beluftningstankene. Den nødvendige meget lave strømningshastighed for affaldsslam opnås ved hjælp af en pumpe, der indstilles til en højere hastighed og kun kører i intervaller styret af en timer. Pumpen kører f.eks. pumpen i 10 sekunder pr. minut, hvor den pumper med 3 ml/min., hvilket giver en strømningshastighed for affaldsslam på 0,5 ml/min.

Filtreringsapparat eller centrifuge

13. Kapitel C10 A, afsnit 23, finder anvendelse.

Analyseudstyr

14. Kapitel C.10 A, afsnit 24, finder anvendelse.

Vand

▼M4

15. Kapitel C.10 A, afsnit 25 og 26, finder anvendelse.

Organisk materiale

16. Kapitel C.10 A, afsnit 27, finder anvendelse.

Syntetisk spildevand

17. Kapitel C.10 A, afsnit 28, finder anvendelse.

Husholdningsspildevand

18. Kapitel C.10 A, afsnit 29, finder anvendelse.

Aktiveret slam

19. Kapitel C10 A, afsnit 30, finder anvendelse.

Stamopløsninger af testkemikaliet

20. Kapitel C.10 A, afsnit 31 og 32, finder anvendelse.

FREMGANGSMÅDE

Fremstilling af inokulum

21. Kapitel C.10 A, kun afsnit 34, finder anvendelse — brug aktiveret slam (ca. 2,5 g/l).

Antal testenheder

22. Til en enkel test, f.eks. måling af den procentvise eliminering, kræves kun en enkelt SRT. Hvis der skal indsamles data til beregning af tentative kinetiske konstanter, kræves der dog fire eller fem SRT-værdier. Der vælges normalt værdier mellem 2 og 10 dage. I praksis udføres en test med fire eller fem SRT'er samtidig ved én temperatur. Ved udvidede forsøg benyttes de samme SRT-værdier eller måske et andet interval af værdier ved andre temperaturer inden for et interval fra 5-20 °C. Ved primær bionedbrydning (hovedanvendelse) kræves normalt kun én enhed pr. sæt betingelser. For at opnå den ultimative biologiske nedbrydelighed kræves en kontrolenhed for hvert sæt betingelser, og denne enhed tilføres spildevand, men ikke testkemikalie. Hvis testkemikaliet anses for at være til stede i det brugte spildevand, skal der anvendes kontrolenheder i forbindelse med vurderingen af den primære biologiske nedbrydning, hvorefter beregningerne korrigeres som nødvendigt.

Dosering af organisk materiale og testkemikalie

23. Kapitel C.10 A, afsnit 36-39, finder anvendelse. Det bør dog bemærkes, at opløsningen af testkemikalier doseres separat, og at der benyttes forskellige overløbsprocenter for slam. Strømningshastigheder for indløb, udløb og slamoverløb overvåges og justeres eventuelt inden for ± 10 % f.eks. to gange om dagen. Hvis der opstår problemer i forbindelse med analysemetoderne, når der benyttes husholdningsspildevand, kan testen gennemføres med syntetisk spildevand. Det skal dog sikres, at de forskellige medier giver sammenlignelige kinetiske data.

Håndtering af enheder til aktiveret slam

24. Kapitel C.10 A, afsnit 40 til 43, finder anvendelse. SRT kontrolleres dog kun ved »konstant« slamoverløb.

Prøvetagning og analyse

25. Kapitel C.10 A, afsnit 44-50, finder anvendelse. Dog skal koncentrationen af testkemikaliet og evt. DOC bestemmes. COD bør ikke anvendes.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

26. Kapitel C.10 A, afsnit 52-54, finder anvendelse.

Angivelse af testresultater

27. Kapitel C.10 A, afsnit 56-62, finder anvendelse.

Beregning af kinetiske konstanter

28. Det er mere realistisk at anføre testkemikaliets gennemsnitlige steady state-koncentration i udløbet og beskrive, hvordan denne værdi varierer med driftsforhold, end at anføre den procentvise primære biologiske nedbrydning. Dette kan gøres ved hjælp af ligningen (6) i tillæg 6.2, der kan give værdier til K_S, μ_m og θ_{SC}, den kritiske slamretentionstid.

(Alternativt kan de omtrentlige værdier for K_S og μm fås ved hjælp af et simpelt computerprogram, som tilpasser den teoretiske kurve, der er beregnet ud fra ligning 2 (tillæg 6.2), til de målte forsøgsværdier. Selv om en given løsning ikke vil være unik, kan der fås en brugbar tilnærmelse af K_S og μ_m.)

Resultaters variabilitet

29. Det er velkendt, at der opnås variable værdier for kinetiske parametre for forskellige kemikalier. Det antages, at de forhold, som slammet er udviklet under, og de aktuelle betingelser i testen (som i afsnit 5 og i andre testforløb) i væsentlig grad påvirker de resulterende værdier. Et af aspekterne ved denne variabilitet er blevet behandlet af Grady et al. (4), der har foreslået, at udtrykkene »extant« og »intrinsic« burde anvendes i forbindelse med to ekstreme forhold, der repræsenterer grænserne for den fysiologiske tilstand, en dyrkning kan opnå i forbindelse med et kinetisk eksperiment. Hvis tilstanden ikke må ændres under testen, afspejler de kinetiske parameterværdier de forhold i miljøet, hvorfra mikroorganismerne blev udtaget. Disse værdier kaldes »extant« eller i daglig tale »eksisterende«. Ved det andet ekstreme forhold, hvor testens betingelser går ud på at tillade den fulde udvikling af proteinsyntesesystemet og tillade den størst mulige vækstrate, kaldes de opnåede kinetiske parametre »intrinsic«, og de er kun afhængige af substratets tilstand og bakterietyperne i dyrkningen. Som en vejledning kan man tænke på, at »extant values« opnås ved at holde forholdet mellem koncentrationen af substrat og kompetente mikroorganismer (S_o/X_o) lavt, f.eks. 0,025, hvorimod der er tale om »intrinsic values«, når forholdet er højt, f.eks. mindst 20. I begge tilfælde skal S_o være lig med eller større end den relevante værdi for Ks (halvmætningskonstanten).

30. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (5). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensningsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

LITTERATUR:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

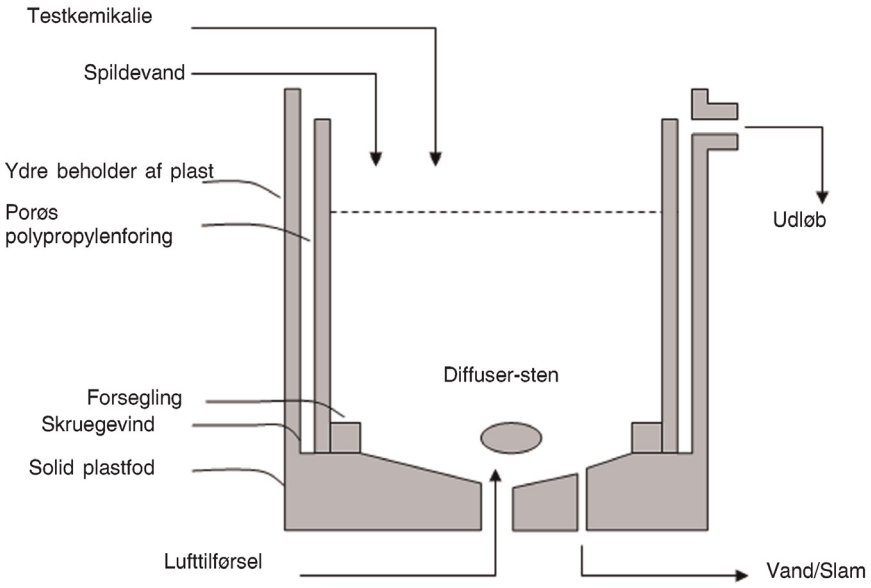
(4) Grady CPL, Smets BF og Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC-Europe, Bruxelles.

▼M4

Tillæg 6.1

Porøs krukke med SRT-styring



▼M4

Tillæg 6.2

Beregning af kinetiske konstanter

1. Når det antages, at Monod-kinetik gør sig gældende, og på baggrund af en massebalance af aktive faststoffer og substrat i det aktiverede slamsystem (1) kan der opnås følgende steady state-udtryk:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

eller

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

hvor:

S_1 = koncentration af substrat i udløb, (mg/l)

K_S = halvmætningskonstant, den koncentration, hvor $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifik vækstrate (d^{-1})

μ_m = maksimumsværdi for μ_m (d^{-1})

K_d = specifik henfaldsrate for aktive faststoffer (d^{-1})

θ_S = slammets gennemsnitlige retentionstid, SRT (d)

En undersøgelse af denne ligning fører til følgende konklusioner:

i) Udløbets koncentration er uafhængig af koncentrationen i indløbet (S_0). Derfor varierer den procentvise biologiske nedbrydning med indløbets koncentration, S_0.

ii) Den eneste parameter for anlægsstyring, der påvirker S_1, er slamretentionstiden, θ_S.

iii) For en given koncentration i indløbet, S_0, vil der være en kritisk slamretentionstid:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

hvor:

θ_{SC} = kritisk slamretentionstid, under hvilken de kompetente mikroorganismer vaskes ud af anlægget.

iv) Da de andre parametre i ligning (2) er knyttet til vækstkinetik, vil temperaturen sandsynligvis påvirke substratniveauet i udløbet og den kritiske slamalder, dvs. at den slamretentionstid, der er nødvendig for at opnå en bestemt behandlingsgrad, stiger med faldende temperatur.

2. På baggrund af en massebalance af faststoffer i systemet med porøse krukker og forudsat, at faststofkoncentration i anlæggets udløb, X_2, er lav i forhold til koncentrationen i beluftningstanken, X_1, vil slamretentionstiden være

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

og

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

hvor:

V = beluftningstankens volumen (l)

X_1 = faststofkoncentration i beluftningstank (mg/l)

X_2 = faststofkoncentrationen i udløb, (mg/l)

Q_0 = gennemstrømningshastighed for indløb (l/d)

Q_1 = gennemstrømningshastighed for affaldsslam (l/d)

Derved kan slamretentionstiden styres ved enhver forudvalgt værdi ved at styre gennemstrømningshastigheden for affaldsslam, Q_1.

Konklusioner:

3. Testens hovedformål er derfor at kunne forudsige udløbets koncentration og dermed niveauerne af testkemikalie i det modtagende vand.

4. Ved at afsætte S_1 i forhold til θ_S kan den kritiske slamretentionstid, θ_{SC}, nogle gange evalueres direkte, f.eks. kurve 3 i figur 1. Når dette ikke er muligt, kan θ_{SC} beregnes, sammen med omtrentlige værdier for μ_m og K_S, ved at afsætte S_1 i forhold til $S_1 \bullet \theta_S$.

En ændring af ligningen (1) giver

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Hvis K_d er lille, bliver $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ og [5]:

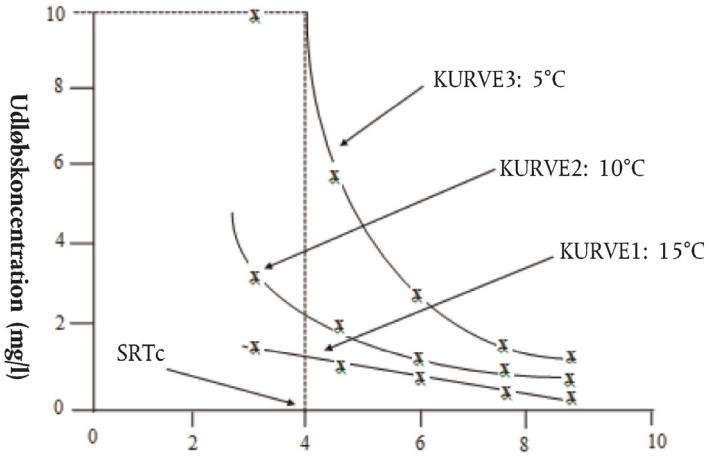
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Grafen skulle dermed blive en lige linje (se figur 2) af hældningen $1/\mu_m$ og skære K_S/μ_m — altså $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

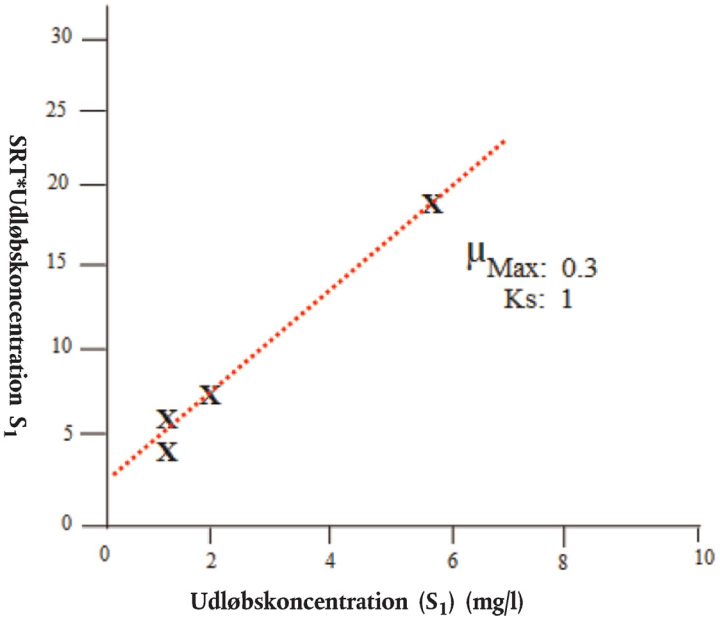
Figur 1

Tre temperaturer; fem SRT'er



Figur 2

Regressionslinje SRT · S_1 over for S_1 ved T = 5 °C



Ordliste:

Udløbskoncentration

Kurve.

▼M4

Tillæg 7

TEST VED LAVT (μg/l) KONCENTRATIONSOMRÅDE

1. Mange kemikalier er normalt til stede i vandmiljøet i meget lave koncentrationer (μg/l) — selv i spildevand. Ved disse koncentrationer fungerer de sandsynligvis ikke som primære substrater, der fremmer vækst. Der er større sandsynlighed for, at de nedbrydes som sekundære substrater uden vækst sideløbende med en række forskellige naturligt forekommende kulstofkemikalier. Nedbrydningen af sådanne kemikalier passer derfor ikke ind i den model, der er beskrevet i tillæg 6. Der findes mange modeller, der kan anvendes, og der kan anvendes flere modeller samtidig under de betingelser, der gælder i spildevandsrensningssystemer. Der kræves betydeligt mere forskning at belyse dette problem.

2. I mellemtiden kan den fremgangsmåde, der er beskrevet i selve teksten (kapitel C.10 A), følges, men kun i forbindelse med primær biologisk nedbrydelighed, hvor der er tale om passende lave koncentrationer (< 100 μg/l) og en valideret analysemetode. Den procentvise biologiske nedbrydning kan beregnes (se afsnit 54 i testmetoden), når blot der tages højde for de abiotiske processer (adsorption, flygtighed osv.). Et eksempel er den undersøgelse, der blev gennemført af Nyholm m.fl. (1) (2), der benyttede en firetimers cyklus i et fill and draw-system. De rapporterede om pseudo-førsteordenskonstanter for fem kemikalier, der blev tilsat syntetisk spildevand i en mængde fra 5 til 100 μg/l. I forbindelse med ultimativ biologisk nedbrydelighed kan der anvendes ^{14}C-mærkede testkemikalier. En beskrivelse af dette ligger uden for omfanget af denne testmetode, idet der endnu ikke er fastlagt alment accepterede fremgangsmåder, selv om et forslag til en metode for ISO 14592 (3) indeholder en vejledning om brugen af ^{14}C-mærkede kemikalier.

SCAS-test

3. Senere blev en enkel totrinstest foreslået (4) (5) (6). Metoden med semikontinuerligt aktiveret slam (SCAS) benyttes i kortvarige kinetiske test på prøver, der er udtaget fra SCAS-enhederne. SCAS-systemet kører med kendte værdier for slamoverløb (i modsætning til den oprindelige C.12-testmetode) og tilføres modificeret syntetisk spildevand som defineret af OECD eller husholdningsspildevand. Det syntetiske spildevand blev modificeret (på grund af en ændret pH-værdi og slammets dårlige sedimentationsevne) ved at tilføre fosfat som buffer, gærekstrakt, jernklorid (III), sporstoffer og salte, og dets COD blev forøget til ca. 750 mg/l ved at forøge koncentrationen af pepton og kødekstrakt. Enhederne kørte i en 24-timers cyklus: beluftning i 23 timer, slamoverløb, sedimentering, eliminering af supernatant (udløb) efterfulgt af tilsætning af syntetisk spildevand plus testkemikalie, op til 100 μg/l (dvs. ved ca. samme koncentration som i den kortvarige test). En gang om ugen udskiftes 10 % af den samlede mængde slam med frisk slam for at opretholde en afbalanceret mikrobiel population.

4. Koncentrationerne af testkemikaliet i starten og ved afslutningen af beluftningen måles, og testen fortsættes, indtil der opnås en konstant eliminering af testkemikaliet. Det kan tage fra en uge til flere måneder.

Kortvarig test

5. En kortvarig test (f.eks. 8 timer) gennemføres for at bestemme den (pseudo) første ordens kinetiske hastighedskonstant for henfaldet af testkemikaliet i aktiveret slam af kendte, men andre oprindelser og historikker. Der udtages slamprøver fra SCAS-reaktorerne — ved afslutningen af en beluftningsperiode, når koncentrationen af organisk substrat er lav — i løbet af et akklimatiseringsforsøg (afsnit 3 og 4). Med henblik på sammenligning kan slam også udtages fra en parallel SCAS-enhed, der ikke er eksponeret for testkemikaliet. Blandinger af slam og testkemikalie, der tilsættes i to eller flere

▼M4

koncentrationer i området 1-50 µg/l, beluftes uden tilførsel af syntetisk spildevand eller andre organiske substrater. Den tilbageværende mængde testkemikalie i opløsningen bestemmes med regelmæssige intervaller, f.eks. hver time afhængigt af kemikaliets nedbrydning, i en periode på højst 24 timer. Prøverne centrifugeres inden relevant analyse.

Beregninger

6. Data fra SCAS-enhederne anvendes til beregning af den procentvise elimination af testkemikaliet (afsnit 54). En gennemsnitlig hastighedskonstant, K_1, (normaliseret med hensyn til koncentration af suspenderede faststoffer) kan beregnes ved hjælp af:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

hvor:

t = beluftningstid (23 timer)

C_e = koncentration ved afslutning af beluftningsperiode (µg/l)

C_i = koncentration ved start af beluftning (µg/l)

SS = koncentration af faststof i aktiveret slam (g/l)

7. I den kortvarige test afsættes den tilbageværende log %-koncentration i forhold til tid, og hældningen af den første del (10-50 % nedbrydning) af kurven svarer til K_1, (pseudo) første ordens konstant. Konstanten normaliseres med hensyn til koncentrationen af slamfaststoffer ved at dividere hældningen med koncentrationen af slamfaststoffer. Det rapporterede resultat skal også indeholde oplysninger om startkoncentrationer af testkemikaliet og de suspenderede faststoffer, slamretentionstid, slamtilførsel og kilde samt oplysninger om (evt.) præeksponering for testkemikaliet.

Resultaters variabilitet

8. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (7). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensningsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

LITTERATUR

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A og Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O og Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP og Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT og Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Miljøstyrelsen. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Miljø- og Energiministeriet, København.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales, SG. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC- Europe, Bruxelles.

▼M4

C.10-B: Biofilm

INDLEDNING

1. Simuleringstest anvendes normal i forbindelse med kemikalier, der ikke har bestået en screeningstest for let bionedbrydelighed (kapitel C.4 A-F i dette bilag (9)), men som har bestået en test for iboende bionedbrydelighed. I enkelte tilfælde anvendes simuleringstest ligeledes i forbindelse med et kemikalie, som man ønsker flere oplysninger om, især kemikalier, der forekommer i store mængder, og normalt anvendes testen af aktiveret slam (C.10 A). Under visse omstændigheder kræves der dog specifikke oplysninger om, hvordan et kemikalie reagerer over for forskellige metoder til spildevandsrensning, som f.eks. biofilm, nedsivnings- eller nedrislingsfiltre, roterende biologiske kontaktorer og fluide bede. Der er udviklet forskellige former for apparatur til dette formål.

2. Gerike et al. (1) benyttede store nedsivningsfiltre i pilotanlægsstørrelse i sammenkoblet tilstand. Disse filtre var meget pladskrævende og krævede relativt store mængder spildevand eller syntetisk spildevand. Truesdale et al. (2) har beskrevet mindre filtre (diameter: 6 fod × 6 tommer), hvortil der blev tilført overfladeaktivt naturligt spildevand, men disse filtre var stadig ret pladskrævende. Der krævedes hele 14 uger til at udvikle en »moden« biofilm, og der krævedes yderligere 4-8 uger efter den første tilsætning af det overfladeaktive teststof, inden akklimatiseringen fandt sted.

3. Baumann et al. (3) udviklede et meget mindre filter, hvori der blev anvendt »polyester-fleece«, som var dyppet i aktiveret slam som det inaktive medie til at støtte biofilmen. Testkemikaliet blev anvendt som eneste kulstofkilde, og bionedbrydeligheden blev vurderet ud fra målinger af opløst organisk kulstof (DOC) i indløb og udløb og ud fra mængden af CO_2 i udgangsgassen.

4. En helt anden tilgang blev benyttet af Gloyna et al. (4), som opfandt den roterende rørreaktor. På den indvendige overflade af det roterende rør dyrkes en biofilm på det kendte overfladeareal ved passage af indløb tilført i toppen af røret, der er skråtstillet i en lille vinkel i forhold til vandret. Reaktoren er blevet brugt dels til at undersøge den biologiske nedbrydelighed af overfladeaktive stoffer (5) og dels til at undersøge den optimale tykkelse af biofilm og diffusionen gennem filmen (6). Forfatterne har videreudviklet reaktoren og modificeret den, så man kan bestemme mængden af CO_2 i udgangsgassen.

5. Den roterende rørreaktor er anerkendt af den britiske »Standing Committee of Analysts« som en standardmetode til vurdering af både den biologiske nedbrydelighed af kemikalier (7) og muligheder for spildevandsrensning og toksicitet i spildevand (8). Fordelene ved den metode, der beskrives her, er, at den er enkel, kompakt og reproducerbar, og at den kun kræver relativt små mængder af organisk materiale.

TESTENS PRINCIP

6. Syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand sammen med testkemikalie, iblandet eller alene, tilføres den indvendige overflade af et langsomt roterende skråtstillet rør. På den indvendige overflade dannes et lag af mikroorganismer, der ligner dem, der findes på medier i biofiltre. Reaktorens driftsbetingelser vælges, så man opnår en passende eliminering af organisk stof og eventuelt oxidation af ammoniak.

▼M4

7. Udløbet fra røret opsamles, hvorefter det enten sedimenteres og/eller filtreres for organisk opløst kulstof (DOC) og/eller for testkemikalie ved hjælp af en specifik metode, inden det analyseres. Kontrolenheder, der ikke får tilført testkemikalier, kører parallelt under samme forhold med henblik på sammenligning. Forskellen mellem koncentrationerne af DOC i udløbet fra test- og kontrolenhederne antages at skyldes testkemikaliet og stoffets organiske metabolitter. Denne forskel sammenlignes med koncentrationen af det tilsatte testkemikalie (som DOC) for at beregne elimineringen af testkemikaliet.

8. Biologisk nedbrydelighed kan normalt skelnes fra biologisk adsorption ved omhyggelig undersøgelse af kurven for elimineringstid. Der kan normalt opnås bekræftelse ved at gennemføre en test for let biologisk nedbrydelighed (iltoptagelse eller kuldioxidproduktion) ved hjælp af et akklimatiseret inokulum, der er udtaget ved afslutningen af testen fra de reaktorer, der får tilført testkemikaliet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionskarakteristik skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt.

10. Flygtige og tungtopløselige kemikalier kan ikke testes, medmindre der tages særlige forholdsregler (se tillæg 5 til kapitel C.10 A). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal ligeledes være kendt, hvis man vil beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrenes målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), DOC.

11. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4 til kapitel C.10 A) kan anvendes i forbindelse med valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

12. Den primære biologiske nedbrydning af de overfladeaktive stoffer skulle oprindeligt nå op på 80 % eller mere, inden kemikaliet kunne markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof kan markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for fjernelse benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for biologisk nedbrydelighed.

REFERENCEKEMIKALIER

13. For at sikre korrekt udførelse af forsøget kan det være nyttigt med jævne mellemrum at teste referencekemikalier, hvis adfærd er velkendt. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre og 1-naphthoesyre.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

14. Den relative standardafgivelse mellem test blev af et laboratorium i Det Forenede Kongerige målt til at være 3,5 % og mellem testene 5 % (7).

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Roterende rørreaktorer

15. Apparaturet (se figur 1 og 2 i tillæg 8) består af en samling akrylrør, der hver måler 30,5 cm i længden og har en indvendig diameter på 5 cm. Rørene er anbragt på gummihjul, der er monteret på en metalramme. Hvert rør har en udvendig flange, ca. 0,5 cm dyb, der skal fastholde det på hjulene. Den indvendige overflade er gjort ru ved hjælp af groft ståluld, og der er en 0,5 cm dyb indvendig flange i rørets øverste ende (indløb) til at holde på væsken. Rørene er skråtstillede i en vinkel på ca. én grad i forhold til vandret for at opnå den nødvendige kontakttid, når testmediet ledes ind i et rent rør. Hjulene med gummidæk roteres ved hjælp af en langsom motor med variabel hastighed. Temperaturen i rørene styres ved at installere apparaturet i konstant rumtemperatur.

16. Ved at placere hvert enkelt rørreaktor inde i et lidt større lukket rør og gøre forbindelserne gastætte kan CO_2-udgangsgassen opsamles i en alkalisk opløsning til efterfølgende måling (6).

17. For hvert rør opbevares forsyning til 24 timer af et organisk materiale, evt. tilsat et testkemikalie, i en 20 l opbevaringsbeholder (A) (se figur 2). Opløsningen af testkemikalie kan evt. doseres separat. Tæt på bunden i hver opbevaringsbeholder er der en udgang, hvorfra der går et rørsystem af f.eks. silikonegummi via en slangepumpe (B) til et glas eller akrylrør, der går 2-4 cm ind i den øverste ende (tilløb) af det skrå rør (C). Udløb kan dryppe fra den nederste ende af det skrå rør og opsamles i en anden opbevaringsbeholder (D). Udløbet sedimenteres eller filtreres inden analyse.

Filtreringsapparat eller centrifuge

18. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 μm) til adsorption af organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 m/s^2.

19. Analyseudstyr til bestemmelse af:

— DOC/samlet organisk kulstof (TOC) eller kemisk iltforbrug (COD)

— specifikt kemikalie (HPLC, GC osv.), hvis påkrævet

— pH, temperatur, syreindhold og alkalinitet

— ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testene gennemføres under nitrificerende forhold.

Vand

20. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC.

21. Destilleret eller deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

▼M4

Organisk materiale

22. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist, at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent (i aktiveret slam) og endda bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC (eller COD) i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumhydrogenfosfat), hvis mediets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. 7,5 ± 0,5 i reaktoren i løbet af testen. Mængden af buffer og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde.

Syntetisk spildevand

23. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

Husholdningsspildevand

24. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsageligt modtager husholdningsspildevand. Det indsamles fra overløbskanalen på den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

Smøremiddel

25. Glycerol eller olivenolie kan bruges til smøring af rullerne i slangepumpen. Begge smøremidler kan bruges på rør af silikonegummi.

Stamopløsninger af testkemikaliet

26. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Se tillæg 5 i kapitel C.10-A om uopløselige kemikalier. Denne metode er ikke velegnet til flygtige kemikalier uden at være modificeret til de rørformede reaktorer (afsnit 16). Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliets vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle værdi for at fastslå,

▼M4

hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.

27. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på 7 ± 0,5. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

FREMGANGSMÅDE

Tilberedning af organisk materiale til dosering

28. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen.

29. Det syntetiske spildevand (afsnit 23) skal fremstilles frisk hver dag, enten af faststofferne eller af den koncentrerede stamopløsning i en passende fortynding med ledningsvand. Afmål den korrekte mængde i en cylinder, og hæld det i en ren indløbstank. Tilsæt om nødvendigt den nødvendige mængde stamopløsning af testkemikaliet eller referencekemikaliet til det syntetiske spildevand før fortynding. Hvis det er mere praktisk eller nødvendigt for at undgå spild af testkemikaliet, kan der fremstilles en separat fortyndet opløsning af testkemikaliet i en separat beholder, som tilføres de skråtstillede rør ved hjælp af en anden doseringspumpe.

30. Alternativt (og fortrinsvis) kan der benyttes sedimenteret husholdningsspildevand (afsnit 24), der opsamles frisk hver dag, hvis det er muligt.

Brug af roterende rørreaktorer

31. Der kræves to identiske rørreaktorer til vurdering af ét testkemikalie, og de opstilles i et rum med konstant rumtemperatur, normalt 22 ± 2 °C.

32. Juster slangepumperne til at pumpe 250 ± 25 ml/h af det organiske materiale (uden testkemikalie) over i de skråtstillede rør, der roteres ved 18 ± 2 rpm. Smøremidlet (afsnit 25) smøres på pumperørene inden brug og med jævne mellemrum i løbet af testen for at sikre korrekt funktion og for at forlænge rørenes levetid.

33. Juster rørenes hældningsvinkel til vandret for at give mulighed for en residenstid på 125 ± 12,5 sek. for det tilførte materiale i et rent rør. Anslå retentionstiden ved at tilsætte en ikke-biologisk markør (f.eks. NaCl, inaktivt farvestof). Den tid, det tager at nå spidskoncentrationen i udløbet, antages at være den gennemsnitlige retentionstid (når der er mest muligt film til stede, kan retentionstiden nå op på ca. 30 minutter).

34. Formålet med disse værdier, hastigheder og tider er at nå frem til tilstrækkelig eliminering (> 80 %) af DOC (eller COD) og for at kunne opnå nitrificerede udløb. Gennemstrømningshastigheden ændres, hvis eliminering ikke er tilstrækkelig, eller hvis der ydelsen på et bestemt rensningsanlæg skal simuleres. I sidstnævnte tilfælde justeres tilsætningen af det organiske materiale, indtil ydelsen i reaktoren passer til ydelsen i rensningsanlægget.

▼M4

Inokulation

35. Luftbåren inokulation kan være tilstrækkelig til at starte væksten af mikroorganismer, når der benyttes syntetisk spildevand, men ellers tilsættes 1 ml/l sedimenteret spildevand til tilløbet i tre dage.

Målinger

36. Med regelmæssige mellemrum kontrolleres det, at dosering og rotationshastighed ligger inden for de angivne grænser. Ligeledes måles pH-værdien i udløbet, især hvis der forventes nitrifikation.

Prøvetagning og analyse

37. Metode, mønster og frekvens for prøvetagning vælges i overensstemmelse med testens formål. Tag f.eks. stikprøver af indløb og udløb, eller indsaml prøver over en længere periode f.eks. 3-6 timer. I den første periode — uden testkemikalie — tages prøverne to gange om ugen. Filtrer prøverne gennem membraner eller i centrifuge ved ca. 40 000 m/s^2 i ca. 15 minutter (afsnit 18). Det kan være nødvendigt at lade prøverne bundfældes og/eller at grovfiltrere prøverne inden membranfiltrering. Foretag som minimum dobbeltbestemmelse af DOC (eller COD) samt BOD, ammoniak og nitrit/nitrat, hvis det er påkrævet.

38. Alle analyser udføres hurtigst muligt efter indsamling og tilberedning af prøverne. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4 °C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring eller ved tilsætning af et velegnet toksisk kemikalie (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l opløsning af kviksølv (II) chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

Indkøringsperiode

39. I denne periode vokser overfladen på biofilmen, så den opnår en optimal tykkelse. Dette varer normalt ca. to uger og bør ikke vare længere end seks uger. Elimineringen (afsnit 44) af DOC (eller COD) tiltager og når en plateauværdi. Når plateauet er nået med samme værdi i begge rør, udvælges et af dem til at være kontrol for resten af testen, hvor deres ydelse skal forblive konsistent.

Tilsætning af testkemikalie

40. På dette tidspunkt tilsættes testkemikaliet til den anden reaktor i den korrekte koncentration, normalt 10-20 mg C/l. Kontrollen tilføres fortsat kun organisk materiale.

Akklimatiseringsperiode

41. Foretag fortsat analyser for DOC (eller COD) to gange om ugen. Hvis den primære biologiske nedbrydningsevne skal vurderes, måles koncentrationen af testkemikaliet også ved hjælp af en specifik analyse. Lad der gå fra en til seks uger (eller længere under særlige forhold), efter at testkemikaliet første gang blev tilsat, for at opnå akklimatisering. Når den procentvise elimination (afsnit 43-45) når op på maksimumsværdi, registreres 12-15 gyldige værdier i plateaufasen over ca. 3 uger med henblik på at evaluere den gennemsnitlige procentvise eliminering. Testen betragtes for afsluttet, hvis der er opnået en tilstrækkelig høj grad af eliminering. Testen bør normalt ikke vare mere end 12 uger efter den første tilsætning af testkemikaliet.

▼M4

Skred på filmen

42. Der sker med relativt regelmæssige mellemrum en pludselig eliminering af større mængder af overskydende film fra rørene, også kaldet skred. For at sammenligneligheden mellem resultaterne ikke påvirkes, gennemføres testene over mindst to fulde cyklusser med vækst og skred.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

43. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikaliet for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

hvor:

D_t = procentvis eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

Cs = koncentration af DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikaliet, fortrinsvis anslået ud fra koncentrationen og den tilførte mængde i stamopløsningen (mg/l)

E = målt DOC eller COD i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

Eo = målt DOC eller COD i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l).

Gentag beregningen for referencekemikaliet, hvis det testes.

Kontrolreaktorens ydelse

44. Graden af DOC- eller COD-eliminering (D_B) af det organiske materiale i kontrolreaktoren er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af biofilmen i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

hvor:

Cm = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløb (mg/l).

45. Beregn elimineringen (D_{ST}) af testkemikaliet (hvis den måles) målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\%$$

hvor:

Si = målt eller fortrinsvis estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

Se = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

▼M4

Hvis analysemetoden giver en positiv værdi i uændret spildevand svarende til S_c mg/l, beregnes den procentvise eliminering (D_{SC}) ved hjælp af ligningen:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Angivelse af testresultater

46. Indtegn den procentvise eliminering D_t og D_{ST} (eller D_{SC}) i forhold til tiden (se tillæg 2 til kapitel C.10- A). Aflæs gennemsnitsafvigelsen (afrundet til nærmeste heltal) og standardafvigelsen af 12-15 værdier for D_T (og evt. for D_{ST}) fra plateaufasen som den procentvise eliminering af testkemikaliet. Ud fra formen på elimineringskurven kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocesserne.

Adsorption

47. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikaliet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikaliet sandsynligvis ved adsorption til biofilmen. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie i faststoffer, der er skredet af filmen. Sædvanligvis forbliver elimineringen af DOC af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikaliet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

Lag-fase

48. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de kompetente bakterier næsten uden eliminering af testkemikaliet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen antages vilkårligt at begynde, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

Plateaufase

49. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Denne fase bør vare mindst tre uger og have ca. 12-15 målte gyldige værdier.

Middelelimineringsgrad for testkemikaliet

50. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne D_t (og evt. D_{st}) for testkemikaliet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver det graden af eliminering af testkemikaliet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien. På tilsvarende måde beregnes middelværdien (D_B) for eliminering af det organiske materiale i kontrolbeholderen.

▼M4

Indikation for bionedbrydning

51. Hvis testkemikaliet ikke tydeligt adsorberer til biofilmen, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 48 og 49), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripning), skal de adsorberede testkemikalier analyseres i filmprøver, eller yderligere statiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indicerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse (kapitel C.4 i dette bilag D, E og F) (9) eller en test, der måler CO_2-produktion (kapitel C.4-C i dette bilag eller Headspace-metoden) (10). Som inokulum anvendes præeksponeret biofilm fra den relevante reaktor.

52. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikaliet er målt, indicerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

Testresultaternes validitet

53. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering (D_B) i kontrolenhederne er > 80 % efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.

54. Hvis der er testet et let biologisk nedbrydeligt (reference) kemikalie, bør graden af biologisk nedbrydelighed være > 90 %, og forskellen mellem dobbeltværdier bør ikke overstige 5 %. Hvis disse to kriterier ikke opfyldes, gennemgås forsøgsprocedurerne, og/eller husholdningsspildevand indhentes fra en anden kilde.

55. Tilsvarende bør forskellene mellem værdier for biologisk nedbrydelighed fra eventuelle dobbeltenheder, der behandler et testkemikalie, ikke afvige mere end 5 %. Hvis dette kriterium ikke opfyldes, men eliminering er høj, fortsættes analysen i yderligere tre uger. Hvis elimineringen er lav, undersøges de hæmmende effekter på testkemikaliet, hvis de ikke er kendte. Testen gentages med en lavere koncentration af testkemikalie, hvis det er muligt.

Testrapport

56. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

— identifikationsdata

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

Testbetingelser:

— enhver modifikation af testsystemet, især hvis der testes uopløselige eller flygtige stoffer

— typen af organisk materiale

— art og andel af industriaffald i spildevandet (hvis anvendt og kendt)

— inokulationsmetode

▼M4

— stamopløsning af testkemikalie — indhold af DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof); hvordan blev den fremstillet (hvis suspension); anvendte testkoncentration(er), hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC, angives årsager; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; enhver ændring i koncentrationen

— gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (uden vækst), rørets rotationshastighed, omtrentlig vinkel på hældning, hvis muligt

— oplysninger om skred (tid og intensitet)

— testtemperatur og -interval

— anvendte analyseteknikker.

Testresultater:

— alle målte, relevante data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur og N-kemikalier)

— alle beregnede værdier af D_t (eller D_{tc}), D_B og D_s opstillet i tabelform og elimineringskurver

— oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikaliet, referencekemikaliet (hvis testet) og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet

— diskussion af resultater.

LITTERATUR:

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed A-F.

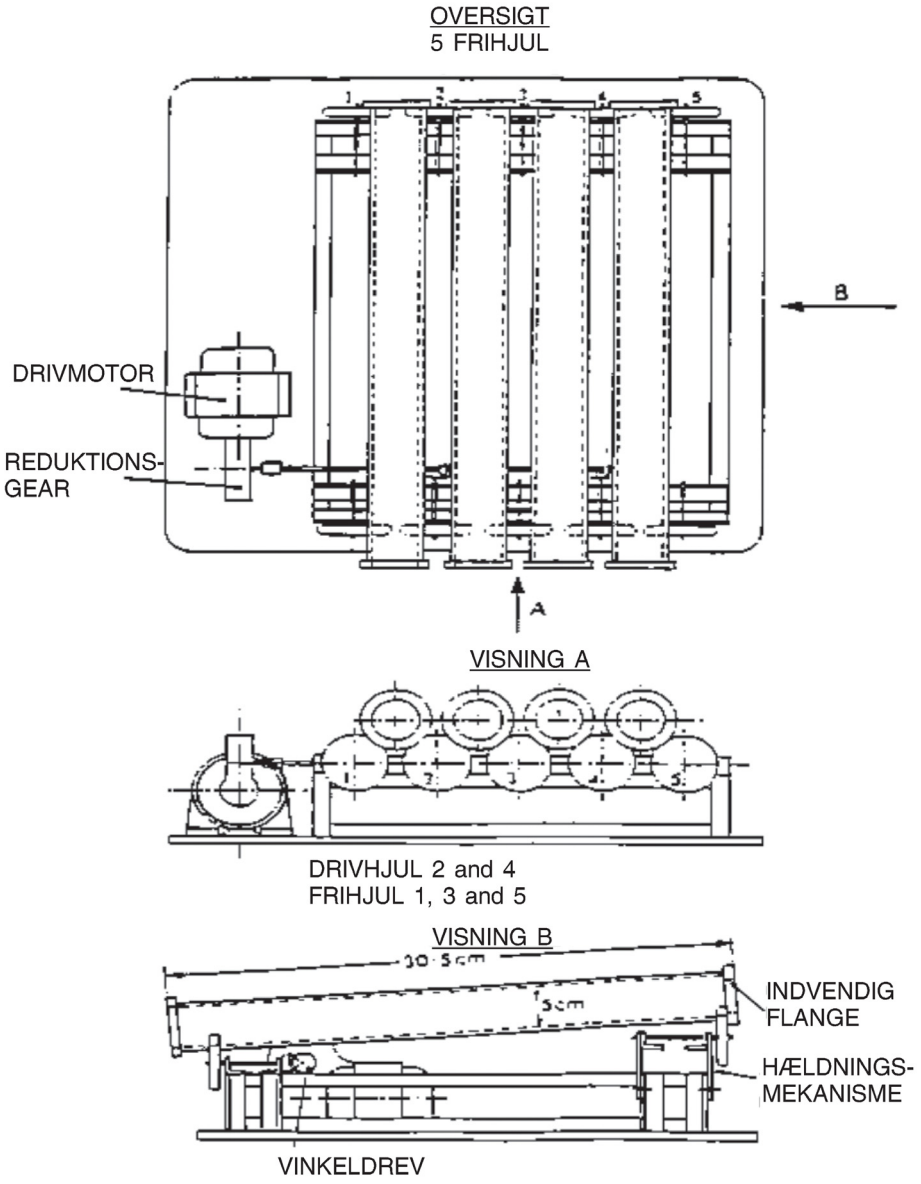
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Tillæg 8

Figur 1

Roterende rør



Ordliste:

Oversigt

Visning A/B

Drivhjul

Frihjul

Drivmotor

Reduktionsgear

Indvendig flange

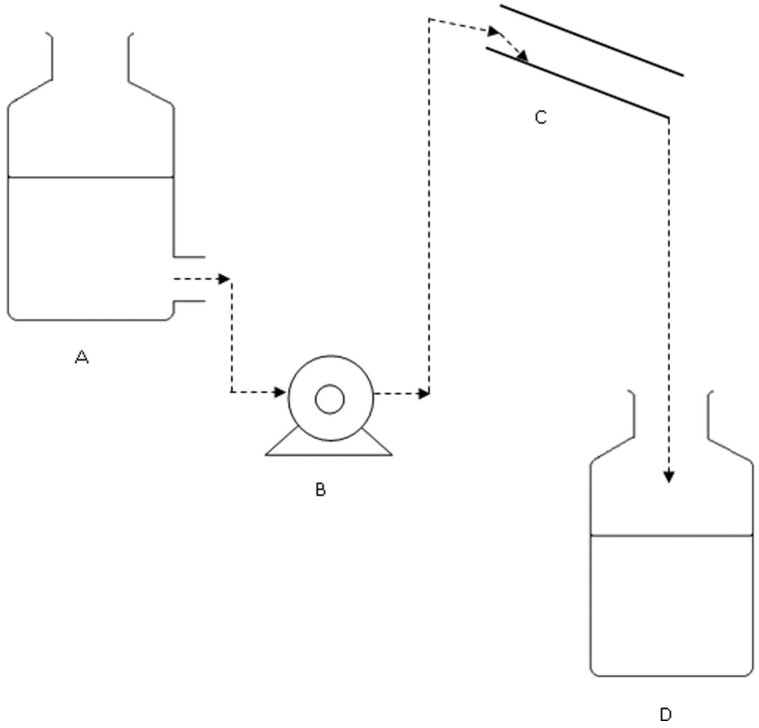
Hældningsmekanisme

Vinkeldrev

▼**M4**

Figur 2

Strømningsdiagram



A: Tilsætningstank

B: Slangepumpe

C: Roterende rør

D: Opsamlingsbeholder til udløb

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Kemikalier: »Det bør bemærkes, at termen »kemikalie« er brugt i bred forstand i UNCED-aftalerne og de efterfølgende dokumenter og omfatter stoffer, produkter, blandinger, præparater eller alle andre termer, der anvendes i eksisterende systemer til at angive dækning«.

▼M6

C.11. AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST (KULSTOF- OG AMMONIUMILTNING)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 209 (2010). Den beskrevne testmetode er en metode til at bestemme virkningen af et kemikalie på mikroorganismer fra aktiveret slam (hovedsagelig bakterier) ved måling af respirationshastigheden (kulstof- og/eller ammoniumiltning) under fastsatte betingelser ved forskellige koncentrationer af testkemikaliet. Denne testmetode er baseret på ETAD-testen (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1)(2), på det tidligere OECD TG 209 (3) og på den reviderede ISO-standard 8192 (4). Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til vurdering af virkningen af kemikalier på mikroorganismerne i det aktiverede slam i spildevandsanlæggets biologiske (aerobe) fase. Resultatet af testen kan også indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af testkemikalier til anvendelse i bionedbrydelighedstest (f.eks. kapitel C.4 A-F, C.9, C.10, C12 og C.29 i dette bilag, OECD TG302C). I dette tilfælde kan testen udføres som en screeningstest, som ligner en test til bestemmelse af dosisinterval eller en grænsetest (se punkt 39), hvor kun den samlede respiration tages i betragtning. Der må dog udvises omhu med at bruge disse oplysninger til test for let bionedbrydelighed (kapitel C.4 A-F og C.29 i dette bilag), hvor inokulumkoncentrationen er betydeligt lavere end den, der bruges i denne testmetode. Fravær af hæmning i denne respirationshæmningstest indebærer ikke automatisk ikke-hæmmende betingelser i testen for let bionedbrydelighed i kapitel C.4 A-F eller C.29 i dette bilag.

2. Generelt lader det til, at respirationshæmningstesten er blevet anvendt med succes, siden den blev offentliggjort, men der er i nogle tilfælde indberettet falske resultater, f.eks. (2)(4)(5). Der forekommer undertiden tofasede koncentrationsrelaterede respirationskurver, forvrængede dosis/responskurver og uventet lave EC_{50}-værdier (5). Undersøgelser har vist, at sådanne resultater fås, når det aktiverede slam, der bruges i testen, nitrificerer i betydelig grad, og testkemikaliet har større virkning på iltningen af ammonium end på den generelle heterotrofe iltning. Disse falske resultater kan derfor afhjælpes ved yderligere testning med en specifik nitrifikationshæmmer. Ved at måle iltoptagelseshastigheden med og uden en sådan hæmmer, f.eks. N-allylthiourinstof (ATU), kan de enkelte samlede iltoptagelseshastigheder ved henholdsvis heterotrof iltning og nitrifikation beregnes (4)(7)(8). Et testkemikalies hæmmende virkninger på de to processer kan således bestemmes, og EC_{50}-værdierne for både iltning af organisk kulstof (heterotrof) og ammoniumiltning (nitrifikation) kan beregnes på sædvanlig vis. Det skal bemærkes, at N-allylthiourinstofs hæmmende virkning i sjældne tilfælde kan ophæves helt eller delvist som følge af kompleksdannelse med testkemikalier eller tilsat substrat, f.eks. Cu^{++}-ioner (6). Cu^{++}-ioner er af afgørende betydning for Nitrosomonas, men er toksiske i højere koncentrationer.

3. Der er opstået et presserende behov for nitrifikation i den aerobe behandling af spildevand i europæiske lande som et nødvendigt trin i fjernelsen af kvælstofforbindelser fra spildevand ved denitrifikation til gasformige produkter; EU har nu fastsat nedre grænser for koncentrationen af kvælstof i behandlet spildevand, der udledes til modtagende vand ([1]).

([1]) Rådets direktiv 91/271/EØF af 21. maj 1991 om rensning af byspildevand, (EFT L 135 af 30.5.1991, s. 40).

▼**M6**

4. Metoden til vurdering af virkningen på iltning af organisk kulstof er tilstrækkelig til de fleste formål. I visse tilfælde er det dog nødvendigt med en undersøgelse af virkningen på nitrifikation alene, eller på både nitrifikation og iltning af organisk kulstof hver for sig, for at kunne fortolke resultaterne og forstå virkningerne.

TESTMETODENS PRINCIP

5. Respirationshastigheden for prøver af aktiveret slam tilført syntetisk spildevand måles i en indkapslet celle, der indeholder en iltelektrode, efter en kontakttid på tre timer. Længere kontakttider kan være hensigtsmæssige for at opnå et realistisk eksponeringsscenarie. Hvis testkemikaliet er hurtigt nedbrydeligt, f.eks. abiotisk ved hydrolyse, eller er flygtigt, og koncentrationen ikke kan opretholdes i tilstrækkelig grad, kan der desuden anvendes en kortere eksponeringsperiode, f.eks. 30 minutter. Følsomheden af hvert parti aktiveret slam bør kontrolleres med et passende referencekemikalie på eksponeringsdagen. Testen bruges typisk til at bestemme testkemikaliets EC_x (f.eks. EC_{50}) og/eller koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).

6. Hæmningen af iltoptagelsen i mikroorganismer, der ilter organisk kulstof, kan udtrykkes særskilt fra iltoptagelsen i mikroorganismer, der ilter ammonium, ved måling af iltoptagelseshastigheden med og uden N-allylthiourinstof, som er en specifik inhibitor af de nitrificerende bakteriers iltning af ammonium til nitrit i første fase. I dette tilfælde beregnes hæmningen i procent af iltoptagelseshastigheden ved sammenligning af iltoptagelseshastigheden med et testkemikalie med den gennemsnitlige iltoptagelseshastighed for de tilsvarende kontroller, der ikke indeholder noget testkemikalie, både med og uden den specifikke inhibitor, N-allylthiourinstof.

7. Iltoptagelse som følge af abiotiske processer kan påvises ved at bestemme hastigheden i blandinger af testkemikalie, syntetisk spildevandssubstrat og vand, idet aktiveret slam udelades.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Testkemikaliets identifikation (fortrinsvis CAS-nummer), navn (IUPAC), renhed, vandopløselighed, damptryk, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Normalt kan flygtige kemikalier ikke testes korrekt, medmindre der træffes særlige forholdsregler (se punkt 21).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

9. Testmetoden kan anvendes på vandopløselige, tungt opløselige og flygtige kemikalier. Der er dog ikke altid muligt at opnå EC_{50}-værdier med kemikalier med begrænset opløselighed, og der kan kun opnås gyldige resultater med flygtige kemikalier, hvis størstedelen (> 80 %) af testkemikaliet er til stede i reaktionsblandingen ved udløbet af eksponeringsperioden/-perioderne. Yderligere analytiske støttedata skal forelægges for at præcisere EC_x-koncentrationen, når der er usikkerhed om testkemikaliets stabilitet eller flygtighed.

▼M6

REFERENCEKEMIKALIER

10. Referencekemikalier skal testes periodisk, for at sikre at testmetoden og -betingelserne er pålidelige, og for at kontrollere følsomheden af hvert parti aktiveret slam, der er brugt som mikrobielt inokulum på eksponeringsdagen. Kemikaliet 3,5-dichlorphenol (3,5-DCP) anbefales som hæmmende referencekemikalie, da det vides at hæmme respiration og bruges i mange typer hæmnings-/toksicitetstest (4). Også kobber-(II)-sulfatpentahydrat kan bruges som referencekemikalie til hæmning af samlet respiration (9). N-methylanilin kan bruges som specifik nitrifikationshæmmer (4).

VALIDITETSKRITERIER OG REPRODUCERBARHED

11. Iltoptagelseshastigheden for blindkontrollerne (uden testkemikalie eller referencekemikalie) må ikke være under 20 mg ilt pr. gram aktiveret slam (tørvægt af opslæmmet faststof) pr. time. Hvis hastigheden er lavere, skal testen gentages med vasket aktiveret slam eller med slam fra en anden kilde. Variationskoefficienten for iltoptagelseshastigheden i kontrolreplikater må ikke overstige 30 % ved den endelige tests afslutning.

12. I den internationale ringtest, der blev tilrettelagt af ISO (4) i 2004, og hvor der blev anvendt aktiveret slam fremstillet af husholdningsspildevand, viste EC_{50} for 3,5-DCP sig at ligge i intervallet 2 mg/l til 25 mg/l for samlet respiration, 5 mg/l til 40 mg/l for heterotrof respiration og 0,1 mg/l til 10 mg/l for respiration ved nitrifikation. Hvis EC_{50} for 3,5-DCP ikke ligger i det forventede område, skal testen gentages med aktiveret slam fra en anden kilde. EC_{50} for kobber-(II)-sulfatpentahydrat bør ligge i området 53-155 mg/l for den samlede respiration (9).

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testbeholdere og -apparatur

13. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:

a) Testbeholdere — f.eks. 1 000 ml bægerglas, som skal indeholde 500 ml reaktionsblanding (se 5 i figur 1)

b) Celle og tilbehør til måling af koncentrationen af opløst ilt, en passende iltelektrode, en indkapslet celle, som skal indeholde prøven, uden headspace og med en skriver (f.eks. 7, 8, 9 i figur 1 i tillæg 2); alternativt kan der bruges en BOD-kolbe med en passende muffeadapter til forsegling af iltelektroden på kolbens hals (se figur 2 i tillæg 3). For at forhindre tab af væske, der fortrænges, når iltelektroden indsættes, tilrådes det først at indsætte en tragt eller et glasrør gennem muffen eller bruge beholdere med tragtformet åbning. I begge tilfælde bør der anvendes en magnetomrører eller en anden omrøringsmetode, f.eks. en selvomrørende sonde

c) Magnetomrørere og stangmagneter, som er overtrukket med inert materiale, til brug i målekammeret og/eller testbeholderne

d) Beluftningsapparatur: Komprimeret luft ledes om nødvendigt gennem et passende filter for at fjerne støv og olie og gennem vaskeflasker, der indeholder vand, for at fugte luften. Beholderens indhold bør beluftes

▼M6

med pasteurpipetter eller beluftningsapparater, der ikke adsorberer kemikalier. En orbitalryster, der kører med orbitale hastigheder på mellem 150 og 250 omdr./min., med kolber med en kapacitet på f.eks. 2 000 ml kan bruges til at dække slammets iltforbrug og løse problemer med kemikalier, der frembringer stærk skumning, er flygtige og derfor går tabt eller er vanskeligt dispergerbare, når de beluftes ved luftgennembobling. Testsystemet er typisk et antal bægerglas, der beluftes kontinuerligt i sekvenser (f.eks. med intervaller på ca. 10-15 minutter) og derefter underkastes en sekventiel analyse. Der kan også anvendes validerede instrumenter, der giver mulighed for samtidig beluftning og måling af iltforbrugshastigheden i blandingerne

e) pH-meter

f) Centrifuge, almindelig bordcentrifuge til slam med en kapacitet på 10 000 m/s^2.

Reagenser

14. Der bør anvendes reagenser af analysekvalitet i hele testen.

Vand

15. Der bør kun bruges destilleret eller deioniseret vand, som indeholder under 1 mg/l opløst organisk kulstof, medmindre ledningsvand uden chlor er specificeret.

Syntetisk spildevand

16. Substratet skal fremstilles således, at det indeholder følgende bestanddele i de angivne mængder:

— pepton	16 g
— kødekstrakt (eller et sammenligneligt planteekstrakt)	11 g
— urinstof	3 g
— natriumchlorid (NaCl)	0,7 g
— calciumchloriddihydrat ($CaCl_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— dikaliummonohydrogenphosphat (K_2HPO_4)	2,8 g
— destilleret eller deioniseret vand til 1 liter	

17. Denne opløsnings pH skal være 7,5 ± 0,5. Hvis det fremstillede substrat ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4 °C, dog ikke længere end en uge og under forhold, som ikke ændrer sammensætningen. Det skal bemærkes, at dette syntetiske spildevand er 100 gange så koncentreret som det, der er beskrevet i OECD Technical Report »Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents«, 11. juni 1976, med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.

▼M6

18. Alternativt kan substratets komponenter steriliseres særskilt forud for opbevaringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt, kort tid før testen udføres. Substratet skal blandes grundigt inden brug, og pH skal om nødvendigt justeres til pH 7,5 ± 0,5.

Testkemikalie

19. Der skal fremstilles en stamopløsning til de let vandopløselige teststoffer, dog kun op til den maksimale vandopløselighed (udfældning accepteres ikke). Stoffer med ringe vandopløselighed, blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed og adsorptive stoffer skal afvejes direkte i testbeholderne. I disse tilfælde kan brug af stamopløsninger være et alternativ, hvis opløste koncentrationer af testkemikalierne bestemmes analytisk i testbeholderne (inden tilsætning af aktiveret slam). Hvis der fremstilles Water Accommodated Fractions (WAF — den andel af stoffet, der opløses i vandet), er det desuden afgørende at foretage en analytisk bestemmelse af de opløste koncentrationer af testkemikalierne i testbeholderne. Det bør undgås at bruge organiske opløsningsmidler og dispergeringsmidler/emulgatorer for at forbedre opløseligheden. Sonikering af stamopløsninger og suspensioner inden omrøring, f.eks. natten over, er mulig, når der foreligger tilstrækkelige oplysninger om testkemikaliets stabilitet under sådanne betingelser.

20. Testkemikaliet kan have skadelig indvirkning på pH i testsystemet. De testkemikaliebehandlede blandingers pH skal bestemmes inden forsøgsopsætningen i et indledende forsøg, for at konstatere om det er nødvendigt at justere pH inden den endelige test og igen på dagen for den endelige test. Opløsninger/suspensioner af testkemikalie i vand bør om nødvendigt neutraliseres inden tilsætning af inokulum. Eftersom neutralisering kan ændre kemikaliets kemiske egenskaber, kan der dog, afhængigt af undersøgelsens formål, foretages yderligere test for at vurdere testkemikaliets virkning på slammet uden pH-justering.

21. Flygtige kemikaliers toksiske virkning, navnlig i test, hvor systemet gennembobles, kan give forskellige effektniveauer, der forekommer som følge af tab af stof i eksponeringsperioden. Der bør udvises forsigtighed med sådanne stoffer ved at foretage stofspecifikke analyser af kontrolblandinger, som indeholder stoffet, og ændre beluftningssystemet.

Referencekemikalie

22. Hvis 3,5-dichlorphenol bruges som referencekemikalie, skal der fremstilles en opløsning af 1,00 g 3,5-dichlorphenol i 1 000 ml vand (15). Varmt vand og/eller sonikering bør bruges til at fremskynde opløsningen og bringe opløsningen op til volumen, når den er afkølet til stuetemperatur. Det skal dog sikres, at referencekemikaliet ikke har ændret sig strukturmæssigt. Opløsningens pH skal kontrolleres og om nødvendigt justeres med NaOH eller H_2SO_4 til pH 7-8.

23. Hvis der bruges kobber-(II)-sulfatpentahydrat som referencekemikalie, bruges koncentrationer på 58 mg/l, 100 mg/l og 180 mg/l (en faktor på 1,8). Stoffet afvejes direkte i testbeholderne (29/50/90 mg med henblik på et samlet volumen på 500 ml). Det opløses derefter med 234 ml autoklaveret ledningsvand. Kobber-(II)-sulfatpentahydrat er let opløseligt. Når forsøget påbegyndes, tilsættes 16 ml syntetisk spildevand og 250 ml aktiveret slam.

▼M6

Specifik nitrifikationshæmmer

24. Der bør fremstilles en stamopløsning på 2,32 g/l af N-allylthiourinstof (ATU). Tilsætningen af 2,5 ml af denne stamopløsning til en inkubationsblanding med et slutvolumen på 500 ml giver en slutkoncentration på 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l), som vides at være tilstrækkelig (4) til at forårsage 100 % nitrifikationshæmning i nitrificerende aktiveret slam, som indeholder 1,5 g/l opslæmmet faststof.

Abiotisk kontrol

25. Under visse sjældne betingelser kan et testkemikalie med stærkt reducerende egenskaber forårsage et målbart abiotisk iltforbrug. I sådanne tilfælde er abiotiske kontroller nødvendige for at skelne mellem testkemikaliets abiotiske optagelse og mikrobiel respiration. Abiotiske kontroller kan fremstilles ved at udelade inokulum fra testblandingerne. Abiotiske kontroller uden inokulum kan også anvendes, når der udføres underbyggende analytiske målinger for at bestemme den opnåede koncentration i testens eksponeringsfase, f.eks. når der bruges stamopløsninger af kemikalier med ringe vandopløselighed med komponenter med forskellig vandopløselighed. I specifikke tilfælde kan det være nødvendigt at fremstille en abiotisk kontrol med steriliseret inokulum (f.eks. ved autoklavering eller tilsætning af steriliserende toksiske stoffer). Visse kemikalier producerer eller forbruger kun ilt, hvis overfladearealet er stort nok til reaktion, selv om de normalt kræver en langt højere temperatur eller et langt højere tryk hertil. I denne henseende skal der især fokuseres på peroxy-stoffer. Et steriliseret inokulum giver et stort overfladeareal.

Inokulum

26. Til almindelig anvendelse bør aktiveret slam indsamles fra beluftningstankens udløb eller i nærheden af tankens udløb i et velfungerende spildevandsrensningsanlæg, der primært modtager husholdningsspildevand. Afhængigt af testens formål kan der også anvendes andre passende kilder til aktiveret slam, f.eks. slam fremstillet i laboratoriet, i passende opslæmmet faststof-koncentrationer på 2 g/l til 4 g/l. Slam fra forskellige rensningsanlæg vil dog sandsynligvis havde forskellige karakteristika og forskellig følsomhed.

27. Slammet kan bruges, som det er, men grove partikler bør fjernes ved kortvarig bundfældning, f.eks. 5-15 minutter, og dekantering af det øverste lag af finere slampartikler eller sigtning (f.eks. maskestørrelse på 1 mm^2). Alternativt kan slammet homogeniseres i en blender i ca. 15 sekunder eller derover, men der skal udvises forsigtighed i forhold til de forskydningskræfter og temperaturændringer, der kan forekomme ved lange blandingsperioder.

28. Det er ofte nødvendigt at vaske slammet, f.eks. hvis den endogene respirationshastighed er lav. Slammet skal først centrifugeres i en periode for at producere en klar supernatant og en masse af faststof fra spildevandet, f.eks. i 10 minutter ved ca. 10 000 m/s^2. Supernatantvæsken kasseres, og slammet genopslæmmes i ledningsvand uden chlor under omrystning, hvorefter vaskevandet fjernes ved gencentrifugering og kasseres. Vaske- og centrifugeringsprocessen gentages om nødvendigt. Tørmassen af et kendt volumen genopslæmmet slam bestemmes, og slammet koncentreres ved fjernelse af væske eller yderligere fortynding i ledningsvand uden chlor for at opnå den nødvendige koncentration af slamfaststoffer på 3 g/l. Det aktiverede slam

▼M6

bør beluftes kontinuerligt (f.eks. 2 l/minut) ved testtemperaturen og om muligt bruges på indsamlingsdagen. Hvis det ikke er muligt, bør slammet dagligt tilføres syntetisk spildevand (50 ml syntetisk spildevand/l aktiveret slam) i yderligere to dage. Slammet bruges herefter til testen, og resultaterne accepteres som gyldige, hvis der ikke er forekommet nogen betydelig ændring i dets aktivitet, vurderet ved dens endogene heterotrofe respirationshastighed og respirationshastighed ved nitrifikation.

29. Der kan opstå problemer, hvis der forekommer skumdannelse under inkuberingen i en sådan grad, at skummet og slamfaststofferne, som bæres på skummet, fortrænges fra beluftningsbeholderne. Det forekommer, at skumdannelse blot skyldes tilstedeværelse af syntetisk spildevand, men skumdannelse bør forventes, hvis testkemikaliet er eller indeholder et overfladeaktivt stof. Tab af slamfaststoffer fra testblandingerne vil medføre kunstigt nedsat respirationshastighed, som fejlagtigt kan fortolkes som et resultat af hæmning. Derudover koncentrerer beluftningen af opløsningen med overfladeaktivt middel det overfladeaktive middel i skumlaget; tab af skum fra testsystemet vil sænke eksponeringskoncentrationerne. Skumdannelsen kan kontrolleres med enkle mekaniske metoder (f.eks. lejlighedsvis manuel omrøring med en glasstav) eller ved at tilføje et antiskummiddel uden overfladeaktivt middel baseret på silikoneemulsion og/eller bruge rystekolbemetoden. Hvis problemet hænger sammen med tilstedeværelsen af det syntetiske spildevand, bør spildevandets sammensætning ændres ved at tilsætte et reagens mod skumdannelse ved en hastighed på 50 µl/l. Hvis testkemikaliet forårsager skumdannelse, skal den mængde, der er nødvendig for afhjælpning heraf, bestemmes ved den maksimale testkoncentration, og derefter skal alle individuelle beluftningsbeholdere behandles på samme måde (herunder beluftningsbeholdere, f.eks. beholdere med blindkontroller og referencekemikalie, uden skumdannelse). Hvis der bruges antiskummidler, må der ikke være nogen interaktion med inokulum og/eller testkemikalie.

TESTFREMGANGSMÅDE

30. Hæmningen for tre forskellige iltoptagelser kan bestemmes: samlet, kun heterotrof og som følge af nitrifikation. Normalt bør målingen af hæmningen af den samlede iltoptagelse være tilstrækkelig. Virkningerne på den heterotrofe iltoptagelse som følge af iltning af organisk kulstof og iltning af ammonium skal bestemmes, når der er et specifikt krav om sådanne to særskilte endepunkter for et bestemt kemikalie, eller (frivilligt) for at forklare atypiske dosis/respons-kurver i forbindelse med hæmning af den samlede iltoptagelse.

Testbetingelser

31. Testen skal udføres ved en temperatur på 20 °C ± 2 °C.

Testblandinger

32. Testblandinger (F_T som i tabel 1), der indeholder vand, syntetisk spildevand og testkemikaliet, fremstilles for at opnå forskellige nominelle koncentrationer af testkemikaliet (tabel 1 indeholder et eksempel på volumener af bestanddele). pH justeres om nødvendigt til 7,5 ± 0,5; blandingerne fortyndes med vand, og inokulummet tilsættes med henblik på at opnå lige store endelige volumener i beholderne og påbegynde beluftningen.

Referenceblandinger

33. Blandinger (F_R) fremstilles med referencekemikaliet, f.eks. 3,5-dichlorphenol, i stedet for testkemikaliet på samme måde som testblandingerne.

▼M6

Blindkontroller

34. Blindkontroller (F_B) fremstilles ved begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden i test, hvor testbægerglassene er opstillet sekventielt i intervaller. I test gennemført med udstyr, der giver mulighed for samtidig måling af iltforbruget, bør der indgå mindst to blindkontroller i hvert parti til samtidig analyse. Blindkontroller indeholder et tilsvarende volumen aktiveret slam og syntetisk substrat, men intet test- eller referencekemikalie. De fortyndes med vand til samme volumen som test- og referenceblandingerne.

Abiotisk kontrol

35. Der fremstilles om nødvendigt — f.eks. hvis et testkemikalie vides eller formodes at have stærkt reducerende egenskaber — en blanding F_A med henblik på måling af det abiotiske iltforbrug. Blandingen skal indeholde samme mængder testkemikalie og syntetisk spildevand og have samme volumen som testblandingerne, men indeholder ikke aktiveret slam.

Generel fremgangsmåde og målinger

36. Testblandingerne, referenceblandingerne, blindkontrollerne og de abiotiske kontroller inkuberes ved testtemperaturen under betingelser med tvungen beluftning (0,5 til 1 l/min.) for at holde koncentrationen af opløst ilt over 60-70 % af mætningen og holde slammet i suspension. Det er også nødvendigt at omrøre kulturerne for at holde slammet i suspension. Inkuberingen anses for at begynde med den første kontakt mellem inokulummet af aktiveret slam og de øvrige bestanddele af den færdige blanding. Efter endt inkubering, dvs. efter den angivne eksponeringstid på normalt tre timer, udtages der prøver for at måle hastigheden, hvormed koncentrationen af opløst ilt aftager i den celle, der er udformet til formålet (figur 2 i tillæg 3), eller i en helt fuld BOD-kolbe. Den måde, hvorpå inkuberingerne begynder, afhænger også af det anvendte udstyrs kapacitet til at måle iltforbrugshastigheden. Hvis udstyret f.eks. omfatter en enkelt iltsonde, foretages målingerne individuelt. I dette tilfælde fremstilles de forskellige blandinger, der skal bruges til testen i syntetisk spildevand, men uden inokulum, og de nødvendige portioner slam tilsættes til de enkelte beholdere i serien. Hver inkubering påbegyndes successivt med passende intervaller på f.eks. 10-15 minutter. Alternativt kan målingssystemet omfatte flere sonder, hvilket giver mulighed for flere samtidige målinger; i givet fald kan inokulum tilsættes samtidig til passende grupper af beholdere.

37. Koncentrationen af aktiveret slam i alle blandinger — testblanding, referenceblanding og blindkontrolblanding (men ikke den abiotiske kontrol) — er nominelt 1,5 g/l opslæmmede faststoffer. Iltforbruget måles efter tre timers eksponering. Der udføres yderligere 30-minutters eksponeringsmålinger efter behov som beskrevet i punkt 5.

Slammets nitrifikationspotentiale

38. Der fremstilles blandinger (F_B) som blindkontrolblandingerne og de yderligere »kontrolblandinger« (F_N), men som også indeholder 11,6 mg/l N-allylthiourinstof, for at afgøre om slammet nitrificerer og med hvilken hastighed. Blandingerne beluftes og inkuberes ved 20 °C ± 2 °C i tre

▼M6

timer. Herefter måles iltoptagelseshastigheden, og iltoptagelsen som følge af nitrifikation beregnes.

Testdesign

Test til bestemmelse af dosisinterval

39. Der anvendes om nødvendigt en indledende test til at bestemme det koncentrationsområde for testkemikaliet, der er nødvendigt i en endelig test til bestemmelse af hæmningen af iltforbrug. Alternativt kan fraværet af testkemikaliets hæmning af iltforbruget i en indledende test indikere, at en endelig test er unødvendig, men der skal gennemføres tre forsøg i den indledende test ved den højeste testede koncentration (typisk 1 000 mg/l, men afhængigt af datakrav).

Tabel 1

Eksempler på blandinger til den indledende test

Reagens	Oprindelig koncentration				
Stamopløsning af testkemikalie	10 g/l				
Stamopløsning af syntetisk substrat	Se afsnit 16.				
Stamopløsning af aktiveret slam	3 g/l opslæmmede faststoffer				
Komponenter i blandinger	Dosering i testbeholdere ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Stamopløsning af testkemikalie (ml) (punkt 19-21)	0,5	5	50	0	50
Stamopløsning af syntetisk spildevand (ml) (punkt 16)	16	16	16	16	16
Stamopløsning af aktiveret slam (ml) (punkt 26-29)	250	250	250	250	0
Vand (punkt 15)	233,5	229	184	234	434
Blandingernes samlede volumen (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrationer i blandingen					
Testsuspension (mg/l) Aktiveret slam	10	10	1 000	0	1 000
(opslæmmede faststoffer) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Der anvendes samme fremgangsmåde med referencekemikaliet til indholdet i kolbe F_{R1-3}

40. Testen udføres med mindst tre koncentrationer af testkemikaliet, f.eks. 10 mg/l, 100 mg/l og 1 000 mg/l med en blindkontrol og om nødvendigt mindst tre abiotiske kontroller med de højeste koncentrationer af testkemikaliet (se eksempel i tabel 1). Ideelt har den laveste koncentration ingen virkning på iltforbruget. Iltoptagelseshastigheden og, hvis det er relevant,

▼M6

nitrifikationshastigheden beregnes; herefter beregnes hæmningen i procent. Afhængigt af testens formål kan man dog også blot bestemme en grænsekoncentrations toksicitet, f.eks. 1 000 mg/l. Hvis der ikke forekommer nogen statistisk signifikant toksisk virkning ved denne koncentration, er det ikke nødvendigt at gennemføre yderligere test ved højere eller lavere koncentrationer. Det skal bemærkes, at stoffer med ringe vandopløselighed, blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed og adsorptive stoffer skal afvejes direkte i testbeholderne. I dette tilfælde erstattes det volumen, der er forbeholdt stamopløsningen af teststof, med fortyndingsvand.

Endelig test

Hæmning af samlet iltoptagelse

41. Testen udføres ved en række koncentrationer, der er udledt af den indledende test. I de fleste tilfælde anbefales seks kontroller og fem behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie med fem replikater for at opnå både NOEC og EC_x (f.eks. EC_{50}). Det er ikke nødvendigt at gentage den abiotiske kontrol, hvis der ikke forekom iltoptagelse i den indledende test, men hvis der forekommer signifikant optagelse, foretages abiotisk kontrol for hver enkelt koncentration af testkemikalie. Slammets følsomhed kontrolleres med referencekemikaliet 3,5-dichlorphenol. Slammets følsomhed kontrolleres for hver testserie, da følsomheden vides at svinge. Der udtages i alle tilfælde prøver fra testbeholderne efter tre timer, og om nødvendigt efter yderligere 30 minutter, med henblik på måling af iltoptagelseshastigheden i iltelektrodecellen. Den specifikke respirationshastighed i kontrol- og testblandingerne beregnes på grundlag af de indsamlede data; hæmningen i procent beregnes derefter ud fra ligning 7 nedenfor.

Sondring mellem hæmning af heterotrof respiration og nitrifikation

42. Brugen af den specifikke nitrifikationsinhibitor, ATU, giver mulighed for direkte vurdering af testkemikaliers inhibitoriske virkninger på den heterotrofe iltning og for beregning af virkningerne på nitrifikationshastigheden ved at trække iltoptagelseshastigheden med ATU fra den samlede optagelseshastighed (uden ATU). Der fremstilles to sæt reaktionsblandinger i henhold til de testdesign for EC_x eller NOEC, der er beskrevet i punkt 41, men ATU tilsættes desuden til hver blanding i et sæt til en slutkoncentration på 11,6 mg/l, som har vist sig helt at hæmme nitrifikation i slam med koncentrationer af opslæmmede faststoffer på op til 3 000 mg/l (4). Iltoptagelseshastigheden måles efter eksponeringsperioden; disse direkte værdier repræsenterer kun den heterotrofe respiration, og forskellene mellem disse og den tilsvarende samlede respirationshastighed repræsenterer nitrifikation. Derefter beregnes de forskellige hæmningsgrader.

Målinger

43. Efter eksponeringsperioden/-perioderne overføres en prøve fra den første beluftningsbeholder til iltelektrodecellen (figur 1 i tillæg 2), og koncentrationen af opløst ilt måles straks. Hvis et system med flere elektroder er tilgængeligt, kan målingerne foretages samtidig. Det er afgørende, at omrøringen (ved hjælp af en overtrukket magnet) foregår ved samme hastighed, som når elektroden kalibreres, med henblik på at sikre, at sonden reagerer med minimal forsinkelse på ændringer i iltkoncentrationerne, og give mulighed for regelmæssige og reproducerbare iltmålinger i målebeholderen. Normalt er visse iltelektroders system med en selvomrørende sonde tilstrækkeligt. Cellen bør skylles med vand mellem målingerne. Alternativt kan

▼M6

prøven fyldes i en BOD-kolbe (figur 2 i tillæg 3) udstyret med en magnetomrører. En iltsonde med en muffeadapter indsættes derefter i kolbens hals, og magnetomrøreren startes. I begge tilfælde måles koncentrationen af opløst ilt regelmæssigt og registreres i en periode, normalt 5-10 minutter eller indtil iltkoncentrationen falder til under 2 mg/l. Elektroden fjernes, blandingen hældes tilbage i beluftningsbeholderen, og beluftningen og omrøringen fortsættes, hvis det er nødvendigt med måling efter længere eksponeringsperioder.

Kontrol af testkemikaliekoncentrationen

44. Til nogle formål kan det være nødvendigt at måle testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne. Det skal bemærkes, at hvis der bruges stamopløsninger af:

— stoffer med ringe vandopløselighed,

— blandinger med komponenter med forskellig vandopløselighed eller

— stoffer med god vandopløselighed, men hvor koncentrationen af stamopløsning ligger tæt på den maksimale vandopløselighed,

er den opløste andel ukendt, og den reelle koncentration af testkemikaliet, som overføres til testbeholderne, er ikke kendt. Der er brug for en analytisk vurdering af testkemikaliekoncetrationen i testbeholderne for at bestemme eksponeringen. For at forenkle proceduren foretages den analytiske vurdering inden tilsætning af inokulummet. Fordi kun opløste andele overføres til testbeholderne, kan de målte koncentrationer være meget lave.

45. For at undgå tidskrævende og dyre analyser anbefales det blot at afveje testkemikaliet direkte i testbeholderne og bruge den oprindelige afvejede nominelle koncentration i efterfølgende beregninger. Det er ikke nødvendigt at sondre mellem opløste, uopløste og adsorberede andele af testkemikaliet, fordi alle disse andele forekommer under faktiske betingelser i et spildevandsrensningsanlæg, og andelene kan variere afhængigt af spildevandets sammensætning. Formålet med testmetoden er at give et realistisk skøn over en ikke-hæmmende koncentration, og metoden er ikke hensigtsmæssig til detaljeret undersøgelse af, hvilke andele der bidrager til hæmningen af organismerne i det aktiverede slam. Endelig bør adsorptive stoffer også afvejes direkte i testbeholderne, og der bør anvendes beholdere i silancoatet glas for at minimere tab ved adsorption.

DATA OG RAPPORTERING

Beregning af iltoptagelseshastighederne

46. Iltoptagelseshastighederne beregnes på grundlag af gennemsnittet af de målte værdier, f.eks. den lineære del af kurverne over iltkoncentration som funktion af tid, hvilket begrænser beregningerne til iltkoncentrationer mellem 2,0 mg/l og 7,0 mg/l, eftersom højere og lavere koncentrationer i sig selv har indvirkning på forbrugshastighederne. Udsving ind i koncentrationsområder under eller over disse værdier er af og til uundgåelige og nødvendige, f.eks. når respirationen er voldsomt hæmmet og dermed meget langsom, eller hvis aktiveret slam respirerer meget hurtigt. Det kan accepteres,

▼**M6**

hvis optagelseskurvens forlængede dele er lige, og deres gradienter ikke ændrer sig, når de passerer 2,0 mg/l- eller 7,0 mg/l O_2-grænserne. Eventuelle buede dele af kurven indikerer, at målingssystemet stabiliserer sig, eller at optagelseshastigheden ændrer sig, og må derfor ikke bruges til beregning af respirationshastigheden. Iltoptagelseshastigheden udtrykkes i milligram pr. liter pr. time (mg/l/t.) eller milligram pr. gram tørslam pr. time (mg/g/t.). Iltforbrugshastigheden, R, i mg/l/t. kan beregnes eller interpoleres fra den lineære del af den registrerede kurve over iltfald i henhold til ligning 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad 1)$$

hvor:

Q_1 er iltkoncentrationen i begyndelsen af den udvalgte del af den lineære fase (mg/l)

Q_2 er iltkoncentrationen i slutningen af den udvalgte del af den lineære fase (mg/l)

Δ_t er tidsrummet mellem disse to målinger (min).

47. Den specifikke respirationshastighed (R_s) udtrykkes som den mængde ilt, der forbruges pr. gram slam (tørvægt) pr. time (mg/g/t.) i henhold til ligning 2:

$$R_s = R/SS \qquad 2)$$

hvor SS er koncentrationen af opslæmmede faststoffer i testblandingen (g/l).

48. De forskellige indekser for R, der kan kombineres, er:

S specifik hastighed

T samlet respirationshastighed

N hastighed som følge af respiration ved nitrifikation

H hastighed som følge af heterotrof respiration

A hastighed som følge af abiotiske processer

B hastighed baseret på blindprøver (gennemsnit)

Beregning af iltoptagelseshastigheden som følge af nitrifikation

49. Forholdet mellem samlet respiration (R_T), respiration ved nitrifikation (R_N) og heterotrof respiration (R_H) er givet ved ligning 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad 3)$$

hvor:

R_N er iltoptagelsen som følge af nitrifikation (mg/l/t.)

R_T er den målte hastighed for blindkontrollens iltoptagelse uden ATU (F_B) (mg/l/t.)

R_H er den målte hastighed for blindkontrollens iltoptagelse med ATU (F_N) (mg/l/t.).

▼M6

50. Dette forhold gælder for blindværdier (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotiske kontroller (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) og prøver med testkemikalier (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/g/t.). Den specifikke respirationshastighed beregnes på grundlag af:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad 4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad 5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad 6)$$

51. Hvis R_N er uden betydning (f.eks. < 5 % af R_T i blindkontroller) i en indledende test, må det antages, at den heterotrofe iltoptagelse er lig med den samlede optagelse, og at der ikke forekommer nitrifikation. En alternativ kilde til aktiveret slam ville være nødvendig, hvis testene skulle anvendes til at vurdere virkningerne på heterotrofe og nitrificerende mikroorganismer. Der udføres en endelig test, hvis der konstateres hæmmede iltoptagelseshastigheder med forskellige testkemikaliekoncentrationer.

Beregning af hæmningen i procent

52. Hæmningen i procent, I_T, af det samlede iltforbrug ved hver koncentration af testkemikaliet er givet ved ligning 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad 7)$$

53. Tilsvarende er hæmningen i procent af den heterotrofe iltoptagelse, I_H, ved hver koncentration af testkemikaliet givet ved ligning 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad 8)$$

54. Endelig er hæmningen i procent af iltoptagelsen som følge af nitrifikation, IN, ved hver koncentration givet ved ligning 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad 9)$$

55. Hæmningen i procent af iltoptagelsen afbildes mod logaritmen for testkemikaliekoncentrationen (hæmningskurve, se figur 3 i tillæg 4). Hæmningskurver afbildes for hver beluftningsperiode på tre timer eller yderligere efter 30 min. Den testkemikaliekoncentration, der hæmmer iltoptagelsen med 50 % (EC_{50}), skal beregnes eller interpoleres på grundlag af kurven. Hvis der foreligger passende data, kan man beregne eller interpolere 95 % konfidensgrænser for EC_{50}, kurvens hældning og værdier, som er egnede til at markere begyndelsen af hæmningsintervallet (f.eks. EC_{10} eller EC_{20}) og slutningen af hæmningsintervallet (f.eks. EC_{80} eller EC_{90}).

56. Det skal bemærkes, at det i lyset af den variabilitet, der ofte konstateres i resultaterne, i mange tilfælde kan være vanskeligt også at udtrykke resultaterne i størrelsesorden, f.eks.:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l til 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l til 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Fortolkning af resultaterne

EC_x

▼**M6**

57. EC_x-værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for parameteren, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Karber-metoden eller simpel interpolation (11)). En EC_x-værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x-værdi skal middelværdierne for hver behandling (x) underkastes regressionsanalyse.

Beregning af NOEC

58. Hvis NOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er det nødvendigt med statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater). Passende statistiske metoder anvendes i overensstemmelse med OECD Document on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrollerne ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0{,}05$.

Testrapport

59. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, renhed

— testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. log K_{ow}, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og eventuelt oplysninger om testkemikaliets skæbne, f.eks. adsorption til aktiveret slam)

Testsystem

— kilde, driftsforhold i spildevandsrensningsanlægget og indløbet hertil, koncentration, forbehandling og vedligeholdelse af det aktiverede slam

Testbetingelser

— testtemperatur, pH under testen og eksponeringsfasens/-fasernes varighed

Resultater

— kontrollernes specifikke iltforbrug (mg O2/(g slam × t.)

— alle målte data, hæmningskurve(r) og metode til beregning af EC50

— EC50 og om muligt 95 % konfidensgrænser, eventuelt EC20, EC80; eventuelt NOEC og anvendt statistisk metode, hvis EC50 ikke kan bestemmes

— resultater for samlet hæmning og, hvis det er relevant, for heterotrof hæmning og hæmning ved nitrifikation

— abiotisk iltoptagelse i eventuel fysisk-kemisk kontrol

— referencekemikaliets navn og resultater med dette kemikalie

— alle observationer og afgivelser fra standardproceduren, som kan have haft indflydelse på resultatet.

LITTERATUR

(1) D. Brown, H. R. Hitz og L. Schäfer (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test, *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼**M6**

(2) E. F. King og H. A. Painter (1986), Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results, *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007), ISO 8192 Water Quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, Den Internationale Standardiseringsorganisation.

(5) D. J. Bealing (2003), Document ISO/TC147/WGI/N.183, Den Internationale Standardiseringsorganisation.

(6) H. A. Painter og K. Jones (1963), The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms, *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) H. A. Painter (1986), Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge, *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) B. Robra (1976), Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) S. Fiebig og U. Noack (2004), The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995), ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, Den Internationale Standardiseringsorganisation.

(11) OECD 2006, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

I denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

ECx (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC_{50} er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testen endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode.

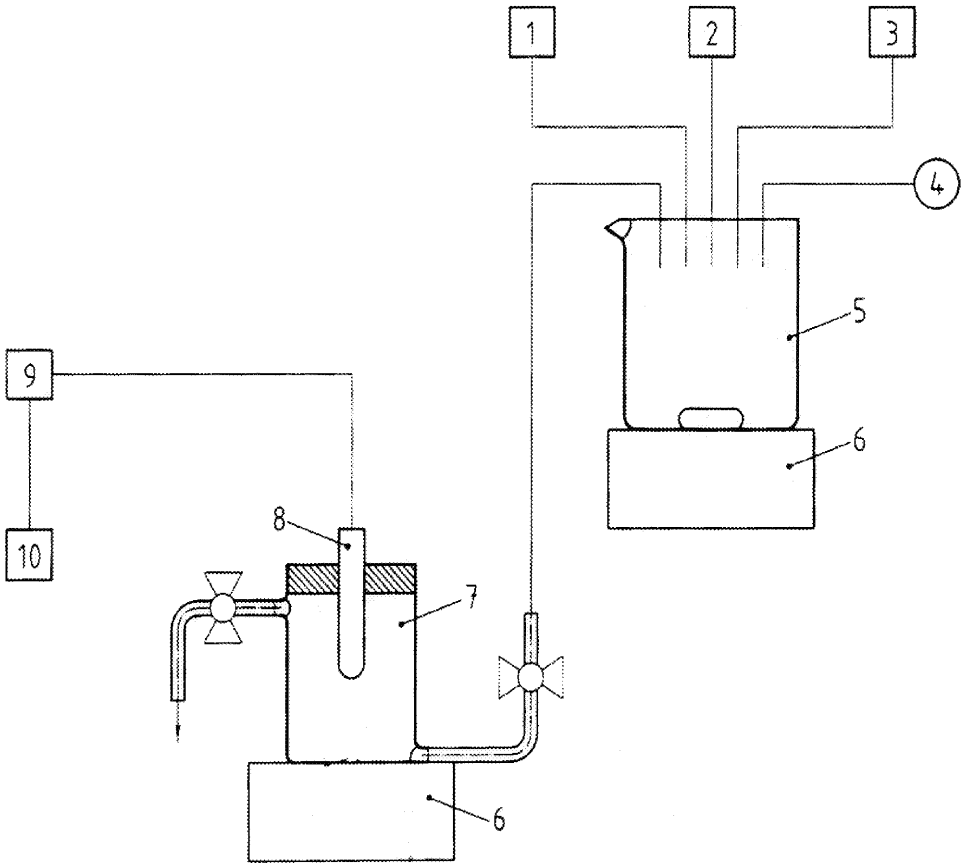
NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼**M6**

Tillæg 2

Fig. 1: **Eksempel på måleenhed**



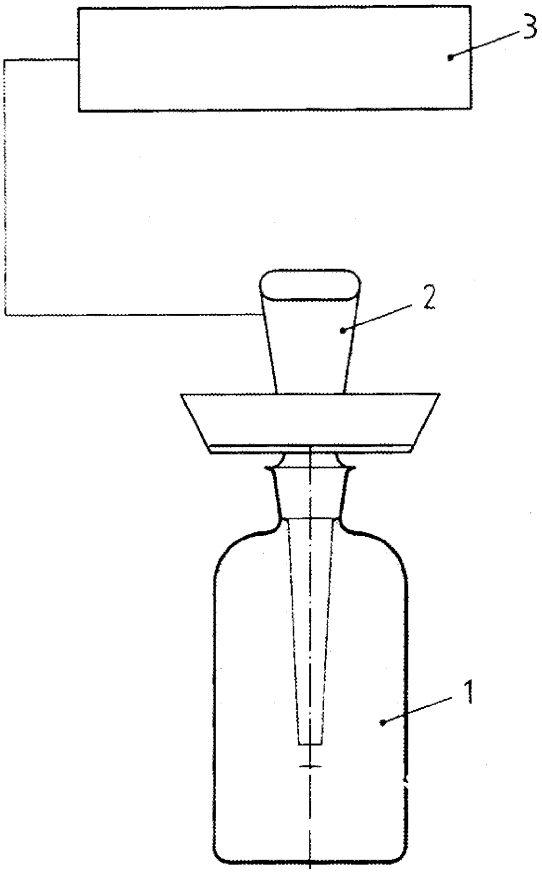
Signaturforklaring

1	aktiveret slam	6	magnetomrører
2	syntetisk substrat	7	celle til iltmåling
3	testkemikalie	8	iltelektrode
4	luft	9	instrument til iltmåling
5	blandebeholder	10	skriver

▼**M6**

Tillæg 3

Fig. 2: **Eksempel på måleenhed med en BOD-kolbe**



Signaturforklaring

1 Testbeholder

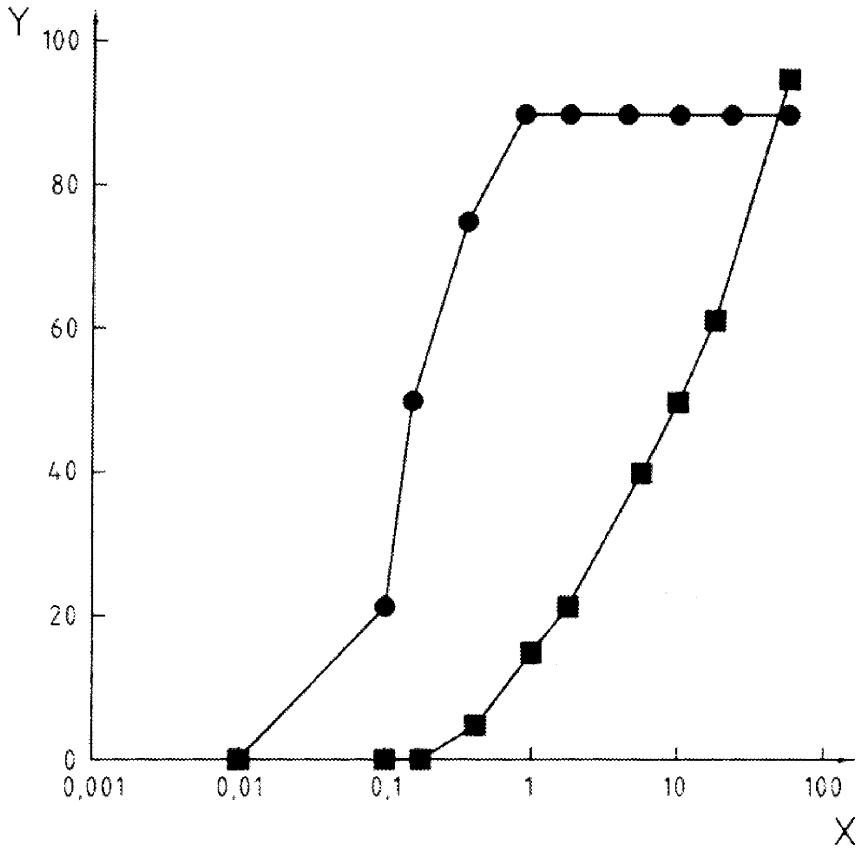
2 iltelektrode

3 instrument til iltmåling

▼**M6**

Tillæg 4

Fig. 3: **Eksempler på hæmningskurver**



Signaturforklaring

X koncentration af 3,5-dichlorphenol (mg/l)

Y hæmning (%)

■ hæmning af heterotrof respiration med nitrificerende slam

● hæmning af nitrifikation med nitrificerende slam.

▼B

C.12. **BIOLOGISK NEDBRYDNING**

MODIFICERET SCAS-TEST

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at bedømme den potentielle fuldstændige bionedbrydelighed af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer, når disse udsættes for ret høje koncentrationer af mikroorganismer over et længere tidsrum. I dette tidsrum holdes mikroorganismerne i live ved en daglig tilførsel af næring bestående af bundfældet spildevand. (I forbindelse med weekenden kan spildevandet opbevares ved 4 ^{o}C, eller det syntetiske spildevand til OECD's confirmatory test kan anvendes).

Der kan finde fysisk-kemisk adsorption sted på de suspenderede faste stoffer, og der skal tages hensyn hertil ved fortolkningen af resultaterne (jf. 3.2).

På grund af den flydende fases lange opholdstid (36 timer), og da der med mellemrum tilføres næringsstoffer, simulerer testen ikke de normale vilkår i et spildevandsanlæg. De resultater, der er opnået med forskellige teststoffer, viser, at denne metode har en høj bionedbrydningsevne.

Delbetingelser, der skabes i denne metode, letter i høj grad selektion og/eller adaptation af mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde teststoffet. (Denne fremgangsmåde kan ligeledes anvendes til at at fremstille akklimatiserede inocula til brug i andre test).

I denne test vurderes teststoffernes fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af koncentrationen af opløst organisk kulstof (DOC). Det bør foretrækkes at bestemme koncentrationen af opløst organisk kulstof efter oprensning af den sure opløsning snarere end som forskellen mellem total C og uorganisk C.

Ved samtidig brug af en specifik analysemetode kan teststoffets primære nedbrydning (nedbrydning af en oprindelige kemiske struktur) vurderes.

Denne metode kan kan anvendes på organiske teststoffer, som ved den i analysen anvendte koncentration:

— er opløselige i vand (mindst 20 mg opløst organisk kulstof/l)

— har et ubetydeligt damptryk

— ikke er hæmmende over for bakterier

— ikke adsorberes væsentligt i testsystemet

— ikke går tabt ved, at testopløsningen skummer.

Teststoffets indhold af organisk kulstof skal være bekendt.

▼B

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen for lidet signifikante resultater og for valg af en egnet testkoncentration.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

C_T = koncentration af organisk kulstof i teststoffet, til stede i eller tilsat det bundfældende spildevand ved begyndelsen af beluftningsperioden (mg/l)

C_t = koncentrationen af opløst organisk kulstof i supernatanten ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l)

C_c = koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrollens supernatant ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l).

Bionedbrydeligheden defineres i denne test som det organiske kulstofs orsvinden. Bionedbrydningen kan udtrykkes som:

1. Den procentvise forsvinden D_{da} af den mængde af stoffet, der tilføres dagligt:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

hvor:

D_{da} = nedbrydning/daglig tilførsel.

2. Den procentvise forsvinden D_{ssd} af den mængde stof, der er til stede ved hver dags begyndelse:

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

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

hvor:

D_{ssd} = nedbrydning/stof ved dagens begyndelse.

Indekserne i og (i+ 1) henviser til testdagen.

Ligning [2(a)] bør anvendes, hvis spildevandets indhold af opløst organisk kulstof svinger fra dag til dag, medens ligning [2(b)] kan anvendes, når mængden af opløst organisk kulstof er forholdsvis konstant fra dag til dag.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelsen af et nyt stof. Der kan imidlertid ikke anbefales noget bestemt referencestof.

Der angives oplysninger om flere forskellige stoffer, der er evalueret i ringtest (jf. tillæg 1), først og fremmest for at testmetoden af og til kan kalibreres, men også for at resultaterne kan sammenlignes, hvis der anvendes en anden metode.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg placeres i en semi-kontinuerlig aktiveret slamenhed (semi-continous activated sludge — SCAS). Teststoffet og bundfældet husholdningsspildevand tilføres, og blandingen beluftes i 23 timer. Beluftningen indstilles derefter, slammet gives tid til at bundfælde sig, og supernatantvæsken fjernes.

Det tilbageblevne slam i beluftningskammeret iblandes dernæst en yderligere mængde af teststoffet og spildevandet, hvorefter cyklussen begynder forfra.

Bionedbrydning konstateres ved at bestemme indholdet af opløst organisk kulstof i supernatantvæsken. Dette resultat sammenlignes med resultatet af analysen af væsken fra en kontrolenhed, som kun er tilført bundfældet spildevand.

Såfremt der anvendes en specifik analysmetode, kan ændringer i koncentrationen af det oprindelige stof som følge af bionedbrydningen måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Denne metodes reporducerbarhed, baseret på fjernelse af opløst organisk kulstof, er endnu ikke fastslået. (For så vidt angår primær bionedbrydning, er der opnået meget nøjagtige data for let nedbrydelige stoffer).

Metodens følsomhed afhænger i vid udstrækning af variabiliteten i blindprøven og i mindre grad af den nøjagtighed, hvormed indholdet af opløst organisk kulstof kan bestemmes, eller af væskens indhold af teststof ved påbegyndelsen af hver enkelt cyklus.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTPROCEDUREN

1.6.1. *Forberedelse*

Et tilstrækkeligt antal rene beluftningsenheder (i stedet kan den oprindelige 1,5 l SCAS-prøveenhed anvendes) og lufttilførselsslanger (figur 1) for hvert enkelt teststof og til kontrollen klargøres. Den komprimerede luft, der tilføres testenhederne, renses med er vatfilter og bør være fri for organisk kulstof og være forudmættet med vand, så fordampningstab reduceres.

Fra et aktiveret slamanlæg, der primært behandler husholdningsspildevand, tages en prøve af blandet væske, indeholdende 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter. Til hver beluftningsenhed kræves ca. 150 ml af den blandede væske.

▼B

Stamopløsninger af teststoffet tilberedes i destilleret vand. Den normalt krævede koncentration er 400 mg organisk kulstof pr. liter hvilket giver en koncentration af teststoffet på 20 mg/l ved påbegyndelsen af hver beluftningscyklus, såfremt der ikke finder bionedbrydning sted.

Der; kan anvendes højere koncentrationer, hvis toksiciteten over for mikroorganismerne tillader det.

Slamopløsningernes indhold af organisk kulstof måles.

1.6.2. *Testbetingelser*

Testen bar foretages ved 20 til 25 °C.

Der anvendes en høj koncentration af aerobe mikroorganismer (fra 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter), og den effektive opholdstid er 36 timer. Det kulstofholdige materiale i det tilførte spildevand iltes grundigt, sædvanligvis inden otte timer efter påbegyndelsen af hver beluftningscyklus. Derefter respirerer slammet endogent i resten af beluftningsperioden, hvorunder det eneste tilgængelige substrat er teststoffet, medmindre også dette metaboliseres hurtigt. Disse forhold, kombineret med daglig genpodning af prøven, når husholdningsspildevand anvendes som medium, giver uhyre gunstige betingelser for såvel akklimatisering som høj grad af bionedbrydning.

1.6.3. *Gennemførelsen af testen*

Der fremstilles en prøve af blandet væske fra en laboratorieenhed, der overvejende behandler husholdningsspildevand eller fra et egnet aktiveret slamanlæg, og prøven opbevares under aerobe betingelser indtil anvendelsen i laboratoriet. Hver beluftningsenhed samt kontrolenheden påfyldes 150 ml (hvis den oprindelige SCAS-test anvendes, multipliceres de anførte volumener med 10) blandet væske, og beluftningen påbegyndes. Efter 23 timers forløb indstilles beluftningen, og slammet bundfældes i 45 minutter. Hanen på hver kolbe åbnes successivt, og der udtages 100 ml af supernatantvæsken. Der klargøres en prøve bundfældet husholdningsspildevand umiddelbart før brug, og 100 ml heraf tilsættes det tilbageblevne slam i hver beluftningsenhed. Beluftningen påbegyndes på ny. På dette stadium tilsættes intet teststof. Enhederne tilsættes dagligt husholdningsspildevand, men kun indtil det tidspunkt, hvor bundfældningen resulterer i en klar supernatant væske. Dette tager sædvanligvis op til to uger, hvorefter det opløste organiske kulstof i supernatantvæsken ved afslutningen af hver beluftningscyklus nærmer sig en konstant værdi.

Ved afslutningen af dette tidsrum blandes de forskellige bundfældede slamprøver, og 50 ml af denne blandede slamprøve tilsættes til hver enhed.

Der tilsættes 95 ml bundfældet spildevand og 5 ml vand til kontrolenhederne, og 95 ml bundfældet spildevand plus 5 ml af den pågældende stamopløsning af teststoffet (400 mg/l) til testenhederne. Beluftningen påbegyndes atter og fortsættes i 23 timer. Slammet bundfældes i 45 minutter, og supernatantvæsken fjernes og analyseres for opløst organisk kulstof.

Ovenstående påfyldnings- og aftapningsprocedure gentages dagligt under hele testens forløb.

▼B

Inden bundfældningen kan det være nødvendigt at rense enhedernes vægge for at forhindre akkumulering af faste stoffer over væskens niveau. For at undgå krydskontaminering anvendes der en separat skraber eller børste for hver enkelt enhed.

Ideelt set bør indholdet af opløst organisk kulstof i supernatantvæskerne bestemmes dagligt, selv om mindre hyppige analyser kan tillades. Inden analysen filtreres væskerne gennem vaskede membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 μm, eller væskerne centrifugeres. Membranfiltre er egnede, hvis der er sikkerhed for, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen. Prøvens temperatur må ikke overstige 40 °C, så længe den er i centrifugen.

Testens varighed er ubestemt for stoffer, der udviser ringe eller ingen bionedbrydning. Erfaringerne viser dog, at den generelt bør vare mindst 12 uger, men ikke længere end 26 uger.

2. DATA OG EVALUERING

Værdierne for indholdet af opløst kulstof i supernatant væskerne i testenhederne og i kontrolenhederne afbildes mod tiden i et koordinatsystem.

Efterhånden som nedbrydningen skrider frem, vil niveauet i testenheden nærme sig niveauet i kontrolenheden. Når forskellen mellem de ro niveauer er konstant i tre på hinanden følgende målinger, gennemføres der et tilstrækkeligt antal yderligere målinger til en statistisk behandling af dataene, og den procentvise bionedbrydning af teststoffet beregnes (D_{da} eller D_{ssd}, jf. 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— fuldstændige oplysninger om spildevandets art, om hvilken type enhed der er anvendt samt om forsøgsresultaterne vedrerende teststoffet, referencestoffet, hvis et sådan er anvendt, og blindprøven

— temperatur

— kurve for det organiske kulstofs forsvinden, med beskrivelse af beregningsmetode (jf. 1.2)

— dato og sted for prøveudtagning af aktiveret slam og spildevand, status vedrørende adaptation, koncentration osv.

— videnskabelige grunde til eventuelle ændringer i testproceduren

— underskrift og dato.

▼B

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Eftersom det stof, der kan testes med denne metode, ikke vil være let bionedbrydeligt, vil enhver forsvinden af opløst organisk kulstof, som udelukkende skyldes bionedbrydning, normalt forløbe gradvis over dage eller uger, undtagen i sådanne tilfælde, hvor akklimatiseringen er pludselig, hvilket fremgår af en abrupt forsvinden efter nogle uger.

Fysisk-kemisk adsorption kan imidlertid nogle gange spille en betydelig rolle. Dette er tilfældet, når der ved begyndelsen indtræder en fuldstændig eller delvis forsvinden af det tilsatte opløste organiske kulstof. Hvad der derefter sker, afhænger af forskellige faktorer, såsom adsorptionsgraden og koncentrationen af suspenderet fast stof i det bortkastede spildevand. Forskellen mellem koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrol- og testenhedernes supernatantvæsker øges sædvanligvis gradvis fra den først indtrufne værdi, og denne forskel forbliver dernæst på den nye værdi under resten af forsøget, medmindre der finder akklimatisering sted.

Når der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption, er yderligere analyser påkrævet. Dette kan gøres på flere forskellige måder, men den mest pålidelige metode er at anvende supernatantvæsken, eller slam, som podestof i en basissættest (helst en respirometrisk test).

Teststoffet, der resulterer i omfattende, ikke adsorptiv forsvinden af opløst organisk kulstof, bør i denne test betragtes som potentielt bionedbrydeligt. Delvis ikke-adsorptiv forsvinden tyder på, at stoffet i hvert fald er bionedbrydeligt til en vis grad.

Ringe eller ingen forsvinden af opløst organisk kulstof kan skyldes teststoffets hæmning af mikroorganismerne. Dette kan ligeledes afsløres af lysis og tab af slam, hvilket giver uklare supernatantvæsker. Testen bør i så fald gentages med anvendelse af en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelsen af en specifik analysemetode eller C-14-mærket teststof kan give større følsomhed. Anvendes der et C-14-teststof, vil genfinding af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der har fundet bionedbrydning sted.

Såfremt der ligeledes angives resultater for primær bionedbrydning, bør der om muligt gives en forklaring på den forandring i den kemiske struktur, der medfører, at det oprindelige teststof ikke kan påvises.

Valideringen af analysemetoden skal anføres sammen med værdierne for blindprøvemediet.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A. Decision of the Council C(81) 30 Final.

▼B

Tillæg 1

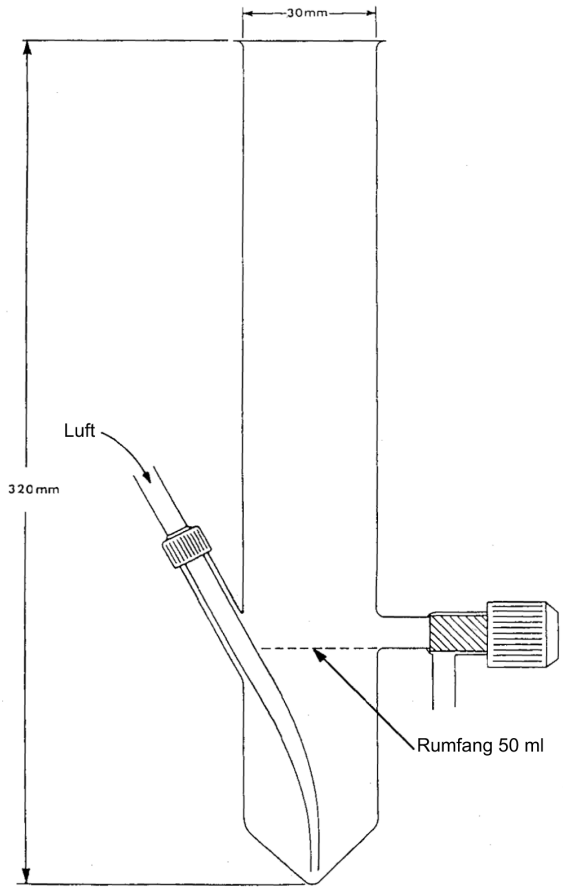
SCAS-test: eksempel på resultater

Stof	C_T (mg/l)	C_t–C_c (mg/l)	Procent bioned-brydning D_{da}	Testens varighed (dage)
4-acetylaminobenzensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropylonbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylen glycol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Tillæg 2

Eksempel på apparatur



▼M7

C.13. **BIOAKKUMULERING I FISK: EKSPONERING I VAND ELLER FØDE**

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 305 (2012). Det overordnede mål med denne revision af forsøgsmetoden er dobbelt. For det første er det hensigten at medtage en test af bioakkumulering i føde ([1]), der kan anvendes til at bestemme bioakkumuleringspotentialet for stoffer med meget lav vandopløselighed. For det andet er formålet at skabe en forsøgsmetode, hvori der af dyrevelfærdshensyn benyttes færre fisk, når det er muligt, og som er mere omkostningseffektiv.

I årene siden vedtagelsen af den konsoliderede forsøgsmetode C.13 (1) er mange stoffer blevet testet, og der er opnået stor erfaring hos både laboratorier og myndigheder. Dette har ført til den overbevisning, at testen kan gøres mindre kompleks, hvis bestemte kriterier er opfyldt (jf. punkt 88), og at en trinvis fremgangsmåde er mulig. Erfaringerne viser også, at biologiske faktorer såsom vækst og fiskenes fedtindhold kan have stor indflydelse på resultaterne og måske skal tages i betragtning. Dertil kommer, at man har erkendt, at test af stoffer, der er meget tungtopløselige i vand, måske ikke er teknisk gennemførlige. For stoffer med meget lav vandopløselighed i vandmiljøet kan eksponering i vand være af begrænset betydning sammenlignet med eksponering i føde. Dette har ført til udviklingen af en forsøgsmetode, hvor fisk eksponeres for stoffer i foderet (jf. punkt 7-14 og 97 ff). En validering (ringtest) af eksponering i føde blev foretaget i 2010 (51).

De vigtigste ændringer omfatter:

— Test af kun en testkoncentration kan anses for at være tilstrækkelig, når det er sandsynligt, at biokoncentreringsfaktoren (BCF) er uafhængig af testkoncentrationen.

— Et begrænset testdesign for eksponering i vand med et reduceret antal prøveudtagningspunkter er muligt, hvis bestemte kriterier er opfyldt.

— Fiskens fedtindhold bør måles, så BCF kan udtrykkes på grundlag af et fedtindhold på 5 %.

— Større fokus på skøn over kinetisk BCF (når det er muligt) samt skøn over BCF ved ligevægt.

— For visse stofgrupper foreslås en test med eksponering i foder, når dette anses for at være mere hensigtsmæssigt end en test med eksponering i vand.

— Fiskenes vægt bør måles, således at BCF_k kan korrigeres for vækstfortynding.

Før bioakkumuleringen testes, bør følgende oplysninger om prøvestoffet være kendt:

a) Analyseteknikkens følsomhed med hensyn til at måle koncentrationer i væv, vand eller foder af både teststof og eventuelle metabolitter (jf. punkt 65).

b) Opløselighed i vand [TM A.6 (2)]; dette bør bestemmes i overensstemmelse med en metode, som er egnet til det (skønnede) opløselighedsinterval for at opnå en pålidelig værdi. For hydrofobe stoffer vil dette normalt være elueringsmetoden med kolonner.

([1]) Se tillæg 1 for definitioner og enheder

▼M7

c) n-octanol/vand-fordelingskoefficient K_{OW} ([1]) [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)], eller andre relevante oplysninger om fordelingsadfærd (f.eks. sorption til lipider, K_{OC}); dette bør bestemmes ved hjælp af en metode, der gør det muligt med det (skønnede) interval for K_{OW} at opnå en pålidelig værdi. For hydrofobe stoffer vil dette normalt være slow-stirring-metoden [TM A.23 (6)].

d) Stoffets stabilitet i vand (hydrolyse [TM C.7 (7)].

e) Stoffets stabilitet i foder (især ved undersøgelser af eksponering i føde).

f) Oplysninger om fototransformation af relevans for irradiationsbetingelserne i testen (8).

g) Overfladespænding (dvs. for stoffer, hvor log K_{OW} ikke kan bestemmes) [TM A.5 (9)]

h) Damptryk [TM A.4 (10)].

i) Oplysninger om biotisk eller abiotisk nedbrydning i vand, herunder (men ikke begrænset til) let bionedbrydelighed [TM C.4, del II til VII (11), C.29 (12)], hvor det er relevant

j) Oplysninger om metabolitter: struktur, log K_{OW}, dannelse og nedbrydelighed, hvis det er relevant.

k) Syrestyrkekonstant (pK_a) for stoffer, der kan ionisere. Om nødvendigt bør testvandets pH tilpasses for at sikre, at stoffet er ikke-ioniseret i testen, hvis dette er foreneligt med fiskearten.

Uafhængigt af den valgte eksponeringsmetode eller prøveudtagningsplan beskriver denne forsøgsmetode en fremgangsmåde til at karakterisere stoffers bioakkumuleringspotentiale i fisk. Skønt gennemstrømningstestsystemer er langt at foretrække, er semistatiske systemer tilladt, forudsat at validitetskriterierne (jf. punkt 24 og 113) er opfyldt. Ved eksponering i foder er gennemstrømningssystemet ikke nødvendigt for at bevare koncentrationer af teststoffet i vand, men vil bidrage til at bevare passende koncentrationer af opløst ilt, sikre rent vand og fjerne indflydelse fra f.eks. udskillelsesprodukter.

Uafhængigt af den valgte forsøgsmetode er denne forsøgsmetode så detaljeret beskrevet, at den kan udføres, samtidig med at der er tilstrækkelig frihed til at tilpasse tilrettelægningen af forsøgene til forholdene i forskellige laboratorier og til teststoffernes forskellige egenskaber. Testen med eksponering i vand anvendes mest hensigtsmæssigt på stabile organiske stoffer med log K_{OW}-værdier på mellem 1,5 og 6,0 (13), men kan også anvendes på stærkt hydrofobe stoffer (log K_{OW} > 6,0), hvis der kan påvises en stabil og fuldt opløst koncentration af teststoffet i vand. Hvis der ikke kan påvises en stabil koncentration af teststoffet i vand, er en undersøgelse af eksponering i vand ikke hensigtsmæssig, og der vil derfor være behov for at anvende en metode, hvor fiskene eksponeres for teststoffet i foderet (selv om fortolkning og anvendelse af resultaterne af undersøgelsen af eksponering i foder kan afhænge af lovrammerne). Forhåndsskøn over

([1]) Undertiden benævnt P_{OW}; bestemt ved hjælp af en rystekolbemetode i TM A.8 (4), en HPLC-metode i TM A.24 (5) og en slow-stirring-metode i TM A.23 (6). Generator-kolonne-teknikken anvendes lejlighedsvis til at bestemme log K_{OW}. Der findes et begrænset antal undersøgelser, hvor denne teknik er brugt, primært til polychlorerede biphenyler og dibenzodioxiner (f.eks. Li and Doucette 1993) (3). For stoffer, der kan ionisere, bør K_{OW} henvise til den ikke-ioniserede form.

▼M7

biokoncentreringsfaktoren (BFC, undertiden betegnet K_B) for organiske stoffer med log K_{OW}-værdier på op til ca. 9,0 kan beregnes med ligningen i Bintein et al. (14). Forhåndsskønnet over biokoncentreringsfaktoren for stærkt hydrofobe stoffer kan være højere end den værdi af ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}), der forventes opnået fra laboratorieforsøg, især når der anvendes en enkel lineær model til forhåndsskønnet. Parametre, der karakteriserer bioakkumuleringspotentialet, omfatter optagelseshastighedskonstanten (k_1), tabshastighedskonstanter, herunder udskillelseshastighedskonstanten (k_2), ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}), den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_K) og fødebiomagnificeringsfaktoren (BMF) ([1]).

Radioaktivt mærkede teststoffer kan gøre analysen af vand-, foder og fiskeprøver lettere og kan benyttes til at bestemme, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af metabolitter. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles alene (f.eks. ved forbrænding eller opløsning af væv), baseres BCF eller BMF på den samlede mængde moderstof, eventuelle tilbageholdte metabolitter og assimileret kulstof. BCF- eller BMF-værdier, der baseres på det samlede indhold af radioaktivt materiale, kan derfor ikke altid sammenlignes direkte med en BCF- eller BMF-værdi, der er bestemt ved specifik kemisk analyse af moderstoffet alene. Adskillelsesprocedurer, f.eks. TLC, HPLC eller GC ([2]), kan anvendes inden analysen i radioaktivt mærkede undersøgelser til at bestemme BCF eller BMF baseret på moderstoffet. Når der anvendes adskillelsesteknikker, bør moderstoffet og relevante metropolitter identificeres og kvantificeres ([3]) (jf. punkt 65), hvis BCF eller BMF skal baseres på koncentrationen af moderstoffet i fiskene og ikke på de samlede radioaktivt mærkede restkoncentrationer. Man kan også kombinere en undersøgelse af metabolisme i fiskene eller in vivo-fordelingsundersøgelse med en biokoncentreringsundersøgelse ved at analysere og identificere stofrester i væv. Muligheden for metabolisme kan forudsiges ved hjælp af egnede værktøjer (f.eks. OECD's QSAR Toolbox (15) og QSAR-programmer).

Beslutningen om, hvorvidt der skal gennemføres en undersøgelse af eksponering i vand eller føde og under hvilke betingelser, bør baseres på faktorerne i punkt 3 og de relevante rammebestemmelser. Eksempelvis bør man for stoffer med en høj log K_{OW}, men stadig stor vandopløselighed med hensyn til tilgængelige analyseteknikkers følsomhed, i første instans overveje eksponering i vand. Oplysninger om vandopløselighed er dog ikke nødvendigvis endelige for disse hydrofobe typer stoffer, så muligheden for at fremstille stabile, målelige opløste vandige koncentrationer (stabile emulsioner er ikke tilladt) for en test med eksponering i vand bør undersøges, før der træffes en afgørelse om forsøgsmetode (16). Det er ikke muligt at give præcis, præskriptiv vejledning om den metode, der skal anvendes, på grundlag af »cut off«-kriterier som vandopløselighed og octanol/vand-fordelingskoefficient, da andre faktorer (analyseteknikker, nedbrydning, adsorption osv.) af ovennævnte grunde kan have en mærkbar indvirkning på metodens anvendelighed. En log K_{OW} på over 5 og en vandopløselighed på under ~0,01-0,1 mg/l angiver de stoffer, hvor test med eksponering i vand kan blive vanskeligere.

Andre faktorer, der kan påvirke valget af test, bør indgå i overvejelserne, herunder stoffets potentiale for adsorption til måleglas og apparater, dets stabilitet i en vandig opløsning kontra dets stabilitet i fiskefoder (17) (18) osv.

Oplysninger om sådanne praktiske aspekter kan findes i andre afsluttede undersøgelser af eksponering i vand. Yderligere oplysninger om evalueringen af aspekter vedrørende bioakkumuleringsundersøgelser findes i litteraturen (f.eks. (19)).

For stoffer, hvor opløseligheden eller opretholdelsen af koncentrationen i vand samt analysen af disse koncentrationer ikke udgør nogen hindring for gennemførelsen af en test med eksponering i vand, er denne metode at foretrække til

([1]) Se tillæg 1 for definitioner og enheder.
([2]) TLC: tyndtlagskromatografi, HPLC: højtryksvæskekromatografi, GC: gaskromatografi.
([3]) Nogle landes lovgivning kan indeholde krav om analyse af metabolitter, såfremt visse betingelser er opfyldt (jf. punkt 65).

▼M7

bestemmelse af stoffets biokoncentreringspotentiale. Under alle omstændigheder bør det kontrolleres, at den/de relevante koncentrationer ved eksponering i vand ligger inden for stoffets opløselighed i testmediet. Der kan anvendes forskellige metoder til at opretholde stabile koncentrationer af det opløste teststof, såsom brug af stamopløsninger eller passive doseringssystemer (f.eks. kolonne-elueringsmetoden), så længe det kan dokumenteres, at der kan opretholdes stabile koncentrationer, og testmediet ikke ændres fra det, der anbefales i punkt 27.

I tilfælde af stærkt hydrofobe stoffer (log K_{OW} > 5 og en opløselighed på under ~ 0,01-0,1 mg/l) kan det blive vanskeligere at teste ved hjælp af eksponering i vand. Årsager til begrænsninger kan være, at koncentrationen i vand ikke kan holdes på et tilstrækkelig konstant niveau (f.eks. som følge af sorption til eksponeringsbeholdernes glas eller hurtig optagelse i fisken), eller at de koncentrationer i vand, der skal anvendes, er så lave, at de er i samme størrelsesorden som eller under den analytiske kvantificeringsgrænse ([1]). For disse meget hydrofobe stoffer anbefales en test med eksponering i foder, forudsat at den er i overensstemmelse med de relevante rammebestemmelser og risikovurderinger.

For overfladeaktive stoffer bør det overvejes, om stoffets egenskaber muliggør testen af biokoncentrering ved eksponering i vand; hvis ikke, er en undersøgelse af eksponering i foder sandsynligvis mere hensigtsmæssig. Overfladeaktive stoffer er stoffer, der fungerer som agenser, som sænker grænsefladespændingen mellem to væsker. Deres amfifile karakter (dvs. at de både indeholder en hydrofil og en hydrofob del) får dem til at samle sig ved grænseflader som vand-luft-grænsefladen, vand-foder-grænsefladen og glasvægge, hvilket gør det vanskeligt at bestemme deres koncentration i vand.

Foderundersøgelsen kan omgå nogle af eksponeringsaspekterne ved komplekse blandinger med komponenter af forskellig vandopløselighed, da der her er større sandsynlighed for en sammenlignelig eksponering for alle blandingens bestanddele end ved metoden med eksponering i vand (jf. (20)).

Det bør bemærkes, at metoden med eksponering i foder giver en fødebiomagnificeringsfaktor (BMF), ikke en biokoncentreringsfaktor (BCF) ([2]). Der findes metoder til at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_K) ud fra data fra undersøgelsen med eksponering i føde (som beskrevet i tillæg 8), men disse metoder bør anvendes med forsigtighed. Generelt forudsætter disse tilgange førsteordenskinetik og kan kun anvendes på visse grupper af forbindelser. Det er usandsynligt, at sådanne metoder kan anvendes til overfladeaktive stoffer (jf. punkt 12).

En begrænset prøveopstilling for eksponering i vand med færre prøveudtagningspunkter for at mindske antallet af dyr og/eller ressourcer (jf. punkt 83 ff.) bør kun anvendes på de stoffer, hvor der er grund til at forvente, at optagelse og udskillelse omtrentlig følger førsteordenskinetik (dvs. i almindelige, ikke-ioniserede organiske stoffer, jf. punkt 88).

C.13 — I: **TEST AF BIOKONCENTRERING MED EKSPONERING AF FISK I VAND**

PRINCIP FOR TESTEN

Testen består af to faser, en eksponeringsfase (optagelsesfase) og en efterfølgende udskillelsesfase. Under optagelsesfasen eksponeres en gruppe fisk af samme art for teststoffet i en eller flere valgte koncentrationer, afhængigt af teststoffets egenskaber (jf. punkt 49). De overføres dernæst til et medium uden teststof, hvor udskillelsesfasen forløber. Der kræves altid en udskillelsesfase, medmindre der kun har været en ubetydelig optagelse af stoffet i eksponeringsfasen. I begge

([1]) Generelt bør de målte koncentrationer i vand under optagelsesfasen være mindst af en størrelsesorden, der ligger over kvantificeringsgrænsen, således at mere end en halveringstid af fiskenes belastning kan måles i udskillelsesfasen.

([2]) Se tillæg 1 for definitioner og enheder.

▼M7

testfaser følges koncentrationen af stoffet i eller på fiskene (eller specificeret væv deraf). Ud over den eksponerede gruppe holdes der samtidig en kontrolgruppe af fisk under samme betingelser, bortset fra at der ikke er noget teststof til stede, så man kan sammenholde eventuelle skadevirkninger i biokoncentreringstesten med en tilsvarende kontrolgruppe og bestemme baggrundskoncentrationer af teststof ([1]).

I testen med eksponering i vand løber optagelsesfasen normalt i 28 dage. Varigheden kan om nødvendigt forlænges (jf. punkt 18) eller afkortes, hvis det kan påvises, at ligevægt er indtrådt tidligere (jf. tillæg 1, definitioner og enheder). Ud fra ligningerne i tillæg 5 kan man forudsige, hvor lang tid optagelsesfasen vil vare, og hvor lang tid der vil gå, inden der opnås ligevægt. Derefter igangsættes udskillelsesperioden, når fiskene ikke længere eksponeres for stoffet, ved at overføre dem til en ren beholder med samme medium, men uden teststof. Når det er muligt, beregnes biokoncentreringsfaktoren både som forholdet mellem koncentrationen i fiskene (C_f) og i vandet (C_W) ved ligevægt, (BCF_{SS}, se tillæg 1, definitioner) og som en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BC_{FK}, se tillæg 1, definitioner og enheder), som anslås til at være forholdet mellem hastighedskonstanterne for optagelse (k_1) og udskillelse (k_2), idet kinetikken antages at være af første orden ([2]).

Hvis der ikke opnås ligevægt inden 28 dage, beregnes BCF enten ved hjælp af den kinetiske tilgang (jf. punkt 38), eller optagelsesfasen kan forlænges. Fører dette til en upraktisk langvarig optagelsesfase, inden ligevægt indtræder (jf. punkt 37 og 38, tillæg 5), foretrækkes den kinetiske metode. Alternativt bør man for meget hydrofobe stoffer overveje en test med eksponering i føde ([3]), forudsat at en sådan er i overensstemmelse med de relevante rammebestemmelser og risikovurderinger.

Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for udskillelse (eller konstanterne, hvis der er tale om mere komplekse modeller), biokoncentreringsfaktoren (ligevægt og/eller kinetisk) og så vidt muligt konfidensgrænser for hver af disse parametre beregnes ud fra den model, der bedst beskriver de målte koncentrationer af teststof i fisk og vand (jf. tillæg 5).

Forøgelsen af antal fisk under prøven vil medføre et fald i koncentrationen af teststoffet i voksende fisk (såkaldt vækstfortynding), og dermed bliver den kinetiske BCF undervurderet, hvis der ikke korrigeres for vækst (jf. punkt 72 og 73).

BCF er baseret på den samlede koncentration i fiskene (dvs. pr. samlet fiskevægt). Til særlige formål kan bestemte vævstyper eller organer (f.eks. muskelvæv eller lever) anvendes, hvis fiskene er tilstrækkeligt store, eller de kan opdeles i en spiselig del (filet) og en ikke-spiselig del (indvolde). Da der for mange organiske stoffer er en tydelig sammenhæng mellem biokoncentreringspotentialet og stoffets hydrofobicitet, er der også en tilsvarende sammenhæng mellem testsfiskenes fedtindhold og stoffernes observerede biokoncentrering. For at mindske denne kilde til udsving i forsøgsresultater for stoffer med høj lipofilicitet (dvs. log K_{OW} > 3) bør biokoncentreringen udtrykkes som normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 % (baseret på den samlede kropsvægt), ud over den, der bestemmes

([1]) For de fleste teststoffer bør der ideelt set ikke konstateres teststofkoncentrationer i kontrolvandet. Baggrundskoncentrationer bør kun være relevante for naturligt forekommende materialer (f.eks. visse metaller) og stoffer, der findes overalt i miljøet.

([2]) Hvis kinetikken tydeligvis ikke er af første orden, bør der tages mere komplekse modeller i brug (jf. henvisningerne i tillæg 5) og søges biostatistisk bistand.

([3]) Optagelsen kan begrænses af lave eksponeringskoncentrationer på grund af lav vandopløselighed i biokoncentreringstesten, mens højere eksponeringskoncentrationer kan opnås i en undersøgelse med eksponering i foder.

▼M7

direkte i undersøgelsen. Dette er nødvendigt for at danne grundlag for en sammenligning mellem resultater for forskellige stoffer og/eller fiskearter. 5 % fedtindhold er bredt anvendt, da det er det gennemsnitlige fedtindhold for fisk, som almindeligvis anvendes i denne forsøgsmetode (21).

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Ud over teststoffets egenskaber som anført i indledningen (afsnit 3) er også andre oplysninger nødvendige såsom toksiciteten for den fiskeart, der bruges i testen, helst den asymptotiske LC_{50} (dvs. tidsuafhængige) og/eller toksicitet skønnet på baggrund af langvarige fisketest (f.eks. TM C.47 (22), C.15 (23) og C.14 (24)).

Der bør være adgang til en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testopløsninger og i biologisk materiale, sammen med oplysninger om, hvordan prøver fremstilles og opbevares. Den analytiske kvantificeringsgrænse for teststoffet i både vand og fiskevæv bør også være kendt. Når et radioaktivt mærket prøvestof bruges, bør det være så rent som muligt (f.eks. helst > 98 %), og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, bør være kendt.

TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testen betragtes som gyldig:

Udsvingene i vandtemperaturen må ikke overstige ± 2 °C, fordi store afvigelser kan påvirke biologiske parametre af relevans for optagelse og udskillelse samt forårsage stress hos dyrene.

Koncentrationen af opløst ilt må ikke falde til en mætning på under 60 %.

Koncentrationen af teststoffet i kamrene skal ligge inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier i eksponeringsfasen.

Koncentrationen af teststoffet skal være under dets opløselighedsgrænse i vand, idet der tages hensyn til testvandets eventuelle indflydelse på effektiv opløselighed ([1]).

Dødeligheden eller andre skadevirkninger/sygdomme i både kontrolfisk og eksponerede fisk udgør under 10 % ved testens afslutning; hvis testen strækker sig over flere uger eller måneder, bør dødeligheden eller andre skadevirkninger i begge fiskegrupper være under 5 % om måneden og højst 30 % i alt. Væsentlige forskelle i gennemsnitlig vækst mellem testen og kontrolgrupperne af udtagne fisk kan være et tegn på, at testkemikaliet har en toksisk virkning.

REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer med kendt biokoncentreringspotentiale og lav metabolisme kan være nyttigt til at kontrollere forsøgsmetoden, når dette er påkrævet (f.eks. når et laboratorium ikke har erfaring med testen, eller forsøgsbetingelserne er blevet ændret).

([1]) For stoffer med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger bør der tages hensyn til vandopløseligheden for hver relevant bestanddel for at bestemme de relevante eksponeringskoncentrationer.

▼M7

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Det bør omhyggeligt undgås, at der i dele af udstyret er anvendt materialer, som kan opløses eller adsorbere, absorbere eller afgive stoffer og have en skadelig virkning på fiskene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardtanke af kemisk inert materiale og passende størrelse (jf. punkt 43) i forhold til mængden af fisk. Bløde plastslanger bør benyttes mindst muligt. Der bør bruges rør og slanger af polytetrafluorethylen, rustfrit stål eller glas. Erfaringerne har vist, at det til teststoffer med høj adsorptionskoefficient såsom syntetiske pyrethroider kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I disse tilfælde bør udstyret kasseres efter brug. Det er mest hensigtsmæssigt at udsætte testsystemer for de koncentrationer af teststoffet, der skal bruges i testen, så længe det er nødvendigt for at dokumentere stabile eksponeringskoncentrationer før indførelsen af testorganismer.

Vand

Til testen benyttes sædvanligvis råvand, som bør være af ensartet kvalitet og stamme fra en ikke-forurenet kilde, men kunstigt fremstillet ferskvand (dvs. demineraliseret vand, der er tilsat specifikke næringsstoffer i kendte mængder) kan være mere egnet til at sikre en ensartet kvalitet over tid. Fortyndingsvandet, dvs. det vand, der blandes med teststoffet, før det hældes i testkarret (jf. punkt 30), bør være af en sådan kvalitet, at den valgte fiskeart kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at fiskenes udseende eller adfærd bliver unormal. Ideelt set bør det godtgøres, at fiskearten kan overleve, vokse og formere sig i fortyndingsvandet (f.eks. i laboratoriekultur eller en toksicitetstest over en hel livscyklus). Fortyndingsvandet bør mindst beskrives i henseende til pH-værdi, hårdhed, tørstof i alt og organisk kulstof i alt (TOC ([1])), og gerne også indhold af ammonium, nitrit og nitrat, samt for saltvandsfisk saltholdighed. Selv om det er velkendt, hvilke parametre der er vigtige for fisks velfærd, er der i tillæg 2 anført anbefalede maksimumkoncentrationer for en række parametre for fersk- og saltvand, der bruges til test.

Vandet bør være af konstant kvalitet under hele forsøget. Dets pH bør være mellem 6,0 og 8,5 ved forsøgets start, men for en given test bør det ligge konstant inden for ± 0,5. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke ubehørigt påvirker forsøgsresultatet (f.eks. ved kompleksdannelse med teststoffet) eller indvirker negativt på fiskebestanden, bør der regelmæssigt tages prøver til analyse og som minimum ved forsøgets start og afslutning. Tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl- og SO42-), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer bør bestemmes f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis fortyndingsvandets kvalitet påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned).

Både det naturlige partikelindhold og det samlede indhold af organisk kulstof i fortyndingsvandet bør være så lavt som muligt, så man undgår adsorption af teststoffet til organisk materiale, hvilket kan nedsætte dets biotilgængelighed og dermed resultere i en undervurdering af BCF. Den højeste acceptable værdi

([1]) TOC omfatter organisk kulstof fra partikler og opløst organisk kulstof, dvs. TOC = POC + DOC.

▼M7

er 5 mg/l for partikler (tørstof, der ikke passerer et 0,45 μm filter) og 2 mg/l for organisk kulstof i alt (jf. tillæg 2). Om nødvendigt bør vandet filtreres inden brug. Bidraget til indholdet af organisk kulstof i testvandet fra testfisk (ekskrementer) og føderester bør holdes så lavt som muligt (jf. punkt 46).

Testopløsninger

Der fremstilles en stamopløsning af teststoffet med en passende koncentration. Den bør fremstilles ved simpelthen at hælde teststoffet i vand og derefter omryste blandingen. Et alternativ kan i visse tilfælde være at bruge et fastfase-desorptionsdoseringssystem. Anvendelse af opløsningsmidler og dispergeringsmidler (opløsende stoffer) anbefales normalt ikke (jf. (25)); anvendelse af disse materialer kan dog være acceptabel til at fremstille en passende koncentreret stamopløsning. Det bør dog så vidt muligt undgås at benytte sådanne materialer, og deres kritiske micellekoncentration bør ikke overskrides (hvis det er relevant). Opløsningsmidler, der kan anvendes, er acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol. Anvendte dispergeringsmidler er Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Opløsningsmidlets koncentration i det endelige testmedium bør være den samme i alle behandlinger (dvs. uanset teststoffets koncentration) og bør ikke overstige de tilsvarende toksicitetsgrænseværdier for opløsningsmidlet under de givne forsøgsbetingelser. Den maksimale koncentration er 100 mg/l (eller 0,1 ml/l). Det er usandsynligt, at en koncentration af opløsningsmidlet på 100 mg/l i væsentlig grad vil ændre den maksimale opløste prøvestofskoncentration, der kan opnås i mediet (25). Opløsningsmidlets og testkemikaliets bidrag til det samlede indhold af organisk kulstof i testvandet bør være kendt. Under hele testen bør koncentrationen af den samlede mængde organisk kulstof i testbeholderne ikke overstige koncentrationen af organisk kulstof hidrørende fra teststoffet og et eventuelt opløsningsmiddel eller opløsende stof ([1]) med mere end 10 mg/l (± 20 %). Indholdet af organiske stoffer kan have en betydelig virkning på mængden af frit opløst teststof i gennemstrømningstest med fisk, især for stærkt lipofile stoffer. Fastfase-mikroekstraktion (jf. punkt 60) kan give vigtige oplysninger om forholdet mellem bundne og frit opløste forbindelser, hvoraf sidstnævnte antages at repræsentere den biotilgængelige fraktion. Prøvestoffets koncentration bør være under teststoffets opløselighedsgrænse i testmediet trods brug af et opløsningsmiddel eller et opløsende stof. Der bør udvises forsigtighed ved brug af let bionedbrydelige opløsningsmidler, da de kan skabe problemer med bakterievækst i gennemstrømningstest. Hvis det ikke er muligt at fremstille en stamopløsning uden brug af opløsende stof, bør der tages hensyn til det hensigtsmæssige i en test med eksponering i vand i modsætning til i føde.

Til gennemstrømningstest kræves der er system, som kontinuerligt leverer og fortynder en stamopløsning af teststoffet (f.eks. doseringspumpe, proportionalfortynder eller mætningssystem), eller et fastfase-desorptionsdoseringssystem til tilførsel af testkemikaliet til testkamrene. Der tilstræbes en udskiftning på mindst fem gange dagligt pr. testkammer. Gennemstrømningsmetoden bør foretrækkes, men kan det ikke lade sig gøre (f.eks. hvis testorganismerne tager skade), kan der bruges en semistatisk teknik, forudsat at validitetskriterierne er opfyldt (jf. punkt 24). Stamopløsningernes og fortyndingsvandets flowhastigheder bør kontrolleres 48 timer før testens begyndelse og derefter mindst dagligt under testen. Ved denne kontrol måles flowhastigheden i hvert testkammer, og det sikres, at det ikke varierer med mere end 20 %, hverken i det enkelte kammer eller mellem kamrene.

([1]) Selv om det normalt ikke anbefales at anvende et opløsningsmiddel eller et opløsende stof, bør det organiske kulstof fra dette middel tilsættes det organiske kulstof fra teststoffet for at vurdere koncentrationen af organisk kulstof i testkarrene.

▼M7

Valg af art

Blandt de vigtige kriterier ved valg af fiskeart er, at den skal være let at få fat i, kunne fås i passende størrelser og let kunne holdes i laboratoriet. Andre kriterier for valg af fiskeart kan være dens rekreative, kommercielle eller økologiske betydning, dens følsomhed i forhold til andre arter og gode erfaringer med den. I tillæg 3 findes en liste over nogle fiskearter, som anbefales til test. Der kan anvendes andre arter, men forsøgsmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Brug af andre arter og en anden undersøgelsesmetode bør i så fald begrundes. Generelt afkorter brugen af små fisk tiden indtil ligevægt, men der kan være behov for flere fisk (prøver) til at sikre en passende analyse af fedtindholdet og teststofkoncentrationer i fiskene. Desuden kan forskelle i åndedrætsrytme og metabolisme mellem unge og ældre fisk hæmme sammenligninger af resultaterne fra forskellige undersøgelser og testarter. Det bør bemærkes, at fiskearter, der testes gennem et (ungfiske)livsstadium med hastig vækst, kan komplicere fortolkningen af data.

Opbevaring af fisk (relevant for eksponering i vand og føde)

Stampopulationen af fisk bør akklimatiseres i mindst to uger i vand ved testtemperaturen (jf. punkt 28) og hele tiden have tilstrækkeligt foder (jf. punkt 45). Både vand og føde bør være af samme type som det, der anvendes under testen.

Efter en 48-timers tilpasningsperiode registreres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

— dødelighed på over 10 % af populationen efter syv dage: hele fiskegruppen forkastes

— dødelighed på mellem 5 og 10 % af populationen efter syv dage: akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage — hvis der er mere end 5 % dødelighed i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— dødelighed under 5 % af populationen på syv dage: fiskegruppen accepteres.

Det bør sikres, at ingen af fiskene til testen har synlige sygdomme eller misdannelser. Syge fisk bør kasseres. Fisk bør ikke behandles mod sygdomme hverken under eller i to uger forud for testen.

TESTENS UDFØRELSE

Forprøve

Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment for at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af eksponerings- og udskillelsesfasen, eller bestemme, om der skal foretages en komplet test. Forprøven bør udformes på en sådan måde, at de nødvendige oplysninger kan indhentes. Det kan overvejes, om en begrænset test kan være tilstrækkelig til at beregne en BCF, eller om der er behov for en komplet test (jf. punkt 83-95 om den begrænsede test).

Eksponeringsbetingelser

Optagelsesfasens længde

Optagelsesfasens længde kan forudsiges på grundlag af praktiske erfaringer (f.eks. fra en tidligere undersøgelse eller en akkumuleringsundersøgelse af et andet kemisk stof, der er strukturelt tilsvarende) eller ved hjælp af forskellige empiriske sammenhænge ud fra kendskab til teststoffets opløselighed i vand eller dets octanol/vand-fordelingskoefficient (forudsat at optagelsen følger førsteordenskinetik, se tillæg 5).

▼M7

Optagelsesfasen bør vare 28 dage, medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt (jf. tillæg 1, Definitioner og enheder). Man taler om ligevægtstilstand i plottet over teststoffet i fisk (C_f) mod tid, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikant stigning i C_f i tid mellem den første og den sidste vellykkede analyse. Ved pooling af prøver til analyse kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende. Hvis ligevægt ikke er indtrådt inden 28 dage, beregnes BCF enten ved hjælp af den kinetiske tilgang alene, hvilket ikke afhænger af, at der opnås ligevægt, eller optagelsesfasen forlænges, idet der foretages yderligere målinger, indtil der opnås ligevægt, eller i 60 dage, alt efter hvilken periode der er kortest. Teststoffets koncentration i fiskene ved afslutningen af optagelsesfasen skal også være tilstrækkelig høj til at sikre et pålideligt skøn over k_2 fra udskillelsesfasen. Hvis der ikke kan påvises en signifikant optagelse efter 28 dage, kan testen afbrydes.

Udskillelsesfasens længde

For stoffer, der følger førsteordenskinetik, er en periode på halvdelen af optagelsesfasen normalt nok til at opnå et passende fald (f.eks. 95 %) i fiskenes belastning med stoffet (jf. redegørelsen for skønnet i tillæg 5). Hvis der skal bruges urealistisk lang tid til at opnå et fald på 95 %, f.eks. dobbelt så lang tid som en normal optagelsesfase (dvs. over 56 dage), kan tidsrummet sættes ned (f.eks. indtil koncentrationen af testkemikaliet er mindre end 10 % af ligevægtskoncentrationen). For stoffer med mere komplekse optagelses- og udskillelsesmønstre end det, hvor fisken betragtes som en helhed, og hvor der gælder førsteordenskinetik, må der dog benyttes en længere udskillelsesfase til bestemmelse af hastighedskonstanterne. Hvis der påvises og/eller forventes sådanne komplekse mønstre, anbefales det at søge råd fra en biostatistiker og/eller farmakokinetiker med henblik på at sikre en korrekt prøveopstilling. I takt med at udskillelsesperioden forlænges, kan antallet fisk til prøveudtagning blive en begrænsning, og vækstforskelle mellem fiskene kan påvirke resultaterne. Periodens længde vil også blive bestemt af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i fiskene overstiger den analytiske kvantificeringsgrænse.

Antal testfisk

Der udvælges så mange fisk pr. testkoncentration, at der mindst er fire fisk til rådighed pr. prøve ved hvert prøveudtagningspunkt. Fisk bør kun pooles, hvis det ikke er muligt at analysere enkelte fisk. Hvis hensigten er at opnå højere præcision i fitningen af kurver (og afledte parametre), eller hvis metabolismeundersøgelser (f.eks. for at skelne mellem metabolitter og moderstof, når der anvendes radioaktivt mærkede prøvestoffer), er der behov for flere fisk pr. prøveudtagningspunkt. Fedtindholdet bør bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til at bestemme teststoffets koncentration. Hvis dette ikke er muligt, kan der blive behov for flere fisk (jf. punkt 56 og 57).

Hvis der anvendes voksne (dvs. kønsmodne) fisk, bør de ikke være i gydealderen eller have gydt for nylig (dvs. at de allerede har gydt) hverken før eller under testen. Det bør også anføres i rapporten, om der er brugt hanner, hunner eller begge køn i eksperimentet. Hvis begge køn er anvendt, bør det påvises, at forskelle i vækst og fedtindhold mellem kønnene ikke er signifikante inden eksponeringen, navnlig hvis det forventes, at det er nødvendigt at poole han- og hunfisk for at sikre påviselige stofkoncentrationer og/eller fedtindhold.

▼M7

Til en given test udvælges fisk med samme vægt, således at den mindste ikke vejer mindre end to tredjedele af den største. Alle fisk bør være af samme årgang og komme fra samme kilde. Da fiskenes alder og vægt undertiden kan indvirke signifikant på BCF-værdierne (12), bør disse oplysninger noteres nøjagtigt. Det anbefales, at man kort inden testens start danner sig et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af fiskebestanden (jf. punkt 61).

Belastning

Der bør være et højt fisk-til-vand-forhold, så faldet i koncentrationen af testblandingen i vand som følge af overførsel af fiskene bliver så lavt som muligt, og for at undgå fald i koncentrationen af opløst ilt. Det er vigtigt, at belastningen afpasses efter den anvendte fiskeart. I alle tilfælde anbefales normalt en fisk-til-vand-belastning på 0,1-1,0 g fisk (vådvægt) pr. liter vand pr. dag. Fisk-til-vand-belastningen kan sættes op, hvis det godtgøres, at den nødvendige koncentration af teststof kan fastholdes inden for ± 20 %, og at koncentrationen af opløst ilt ikke kommer under en mætning på 60 % (jf. punkt 24).

Der skal tages hensyn til fiskeartens normale levevilkår ved valget af belastning. Eksempelvis kan bundfisk kræve et akvarium med større bundareal for samme vandrumfang sammenlignet med pelagiske fiskearter.

Fodring

Under akklimatiserings- og testperioder gives fiskene passende foder med kendt fedt- og proteinindhold i en sådan mængde, at de forbliver sunde og bevarer deres legemsvægt (en vis vækst er tilladt). Fisk fodres dagligt under akklimatiserings- og testperioder i et bestemt omfang, der afhænger af den anvendte art, forsøgsbetingelserne og foderets brændværdi (f.eks. ca. 1 til 2 % af kropsvægten pr. dag for regnbueørred). Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. For at sikre samme fodring bør fodermængden omberegnes, f.eks. en gang om ugen. Til denne beregning kan man skønne vægten af fiskene i de enkelte kamre ud fra vægten af de fisk, der senest er taget op fra det pågældende kammer. De fisk, der bliver tilbage i kamrene, må ikke vejes.

Hver dag kort efter fodringen ($\frac{1}{2}$-1 time) bør overskydende foder og ekskrementer suges op fra testkamrene. Kamrene bør holdes så rene som muligt under testen for at sikre den lavest mulige koncentration af organisk kulstof (jf. punkt 29), eftersom tilstedeværende organisk kulstof kan nedsætte teststoffets biotilgængelighed (12).

Da meget foder er fremstillet af fiskemel, bør det sikres, at foderet ikke påvirker testresultaterne eller fremkalder skadelige virkninger, f.eks. fordi det indeholder (spor af) pesticider, tungmetaller og/eller teststoffet selv.

Lys og temperatur

Det anbefales, at lysperioden er 12-16 timer, og temperaturen (± 2 °C) bør være afpasset efter testfiskenes art (jf. tillæg 3). Belysningens type og karakteristika bør være kendt. Man bør være opmærksom på en eventuel fotokemisk omdannelse af teststoffet under undersøgelsens lysforhold. Der bør benyttes en passende belysning, hvor det undgås, at fisk udsættes for kunstigt fremkaldte fotokemiske omdannelsesprodukter. Det kan i nogle tilfælde være hensigtsmæssigt at afblænde UV-stråling under 290 nm med et filter.

▼M7

Testkoncentrationer

Testen er oprindeligt udviklet til ikke-polære organiske stoffer. For denne type stof forventes eksponering af fisk for en enkelt koncentration at være tilstrækkeligt, da der ikke påregnes koncentrationsvirkninger, selv om to koncentrationer kan være påkrævet i henhold til den gældende lovgivning. Hvis stoffer uden for dette område undersøges, eller andre tegn på mulig koncentrationafhængighed er kendt, bør testen udføres med to koncentrationer mere. Hvis kun en koncentration testes, bør dette begrundes (jf. punkt 79). Den testede koncentration bør være så lav, som er praktisk eller teknisk muligt (dvs. ikke tæt på opløselighedsgrænsen).

I visse tilfælde kan det forventes, at et stofs biokoncentrering afhænger af koncentrationen i vandet (f.eks. af metaller, hvor optagelsen i fisk i det mindste delvist kan reguleres). I sådanne tilfælde skal mindst to, men helst flere koncentrationer af miljømæssig relevans testes (jf. punkt 49). For stoffer, hvor de testede koncentrationer af praktiske grunde skal ligge tæt på opløselighedsgrænsen, anbefales det at teste mindst to koncentrationer, da dette kan give et indblik i eksponeringskoncentrationernes pålidelighed. Valget af testkoncentrationer bør omfatte den miljømæssigt realistiske koncentration samt den koncentration, der er relevant for formålet med den konkrete vurdering.

Den/de valgte koncentration/-er af teststoffet bør være under teststoffets kroniske virkning eller 1 % af dets akutte asymptotiske LC_{50} inden for et miljømæssigt relevant interval og mindst i en størrelsesorden over dets kvantificeringsgrænse i vand ved anvendelse af analysemetoden. Den højest tilladte testkoncentration kan også bestemmes ved at dividere den akutte 96 h LC_{50} med et passende akut/kronisk forhold (f.eks. er passende forhold for nogle kemiske stoffer over 3, mens få er over 100). Hvis der anvendes en anden koncentration, bør den adskille sig fra ovenstående med en faktor på 10. Hvis dette ikke er muligt på grund af toksicitetskriteriet (som begrænser den højeste testkoncentration) og den analytiske grænse (som begrænser den laveste testkoncentration) kan en lavere faktor end 10 anvendes, og det bør overvejes at anvende radioaktivt mærket teststof (af den størst mulige renhed, f.eks. helst > 98 %). Det bør sikres, at de anvendte koncentrationer ikke overstiger teststoffets opløselighedsgrænse i testmedierne.

Kontroller

Ud over testrækken bør der være en kontrol med fortyndingsvand (jf. punkt 30-31) eller, hvis det er relevant, en kontrol med et opløsningsmiddel.

Hyppighed af målinger af vandkvaliteten

Under testen bør opløst ilt, TOC, pH og temperatur måles i alle test- og kontrolbeholdere. Samlet hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder. Hvis to eller flere koncentrationer testes, måles disse parametre ved den højeste koncentration. Som minimum bør opløst ilt og saltholdighed (hvis det er relevant) måles tre gange — ved begyndelsen, midt i og ved afslutningen af optagelsesperioden — og en gang ugentligt i udskillelsesperioden. TOC bør måles ved testens begyndelse (24 timer og 48 timer før igangsættelse af optagelsesfasen), før fiskene overføres, og mindst en gang ugentligt i både optagelses- og udskillelsesfasen. Temperaturen bør måles og registreres dagligt, pH ved begyndelsen og afslutningen af hver periode, og hårdhed en gang pr. test. Temperaturen bør helst følges kontinuerligt i mindst et af karrene.

▼M7

Prøveudtagning og analyse af fisk og vand

Plan for udtagning af prøver af fisk og vand

Der bør, inden fiskene overføres, udtages vandprøver fra testkamrene med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både i optagelses- og i udskillelsesfasen. Vandprøven bør tages før fodring, samtidig med at der udtages fiskeprøver. Hyppigere prøveudtagning kan være nyttig for at sikre stabile koncentrationer efter overførslen af fiskene. I optagelsesfasen bør teststofkoncentrationen bestemmes for at kontrollere, at validitetskriterierne er opfyldt (jf. punkt 24). Hvis analyser af vandet fra starten af udskillelsesfasen viser, at der ikke er påvist teststof, kan dette bruges som begrundelse for ikke at måle test- og kontrolvand for teststof i den resterende del af udskillelsesfasen.

Der bør udtages prøver af fisk mindst fem gange i optagelsesfasen og mindst fire gange i udskillelsesfasen med henblik på analyse for teststof. Da det i nogle tilfælde vil være vanskeligt at foretage et rimeligt præcist skøn over BCF-værdien ud fra dette prøveantal (især hvis det formodes, at udskillelsen ikke følger en simpel førsteordensoptagelse og -kinetik), kan det anbefales at øge prøveudtagningshyppigheden i begge perioder (jf. bilag 4).

Fedtindholdet bør mindst ved optagelsesfasens start og afslutning og udskillelsesfasens afslutning bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til bestemmelse af teststoffets koncentration. Hvis dette ikke er muligt, bør der udtages mindst tre uafhængige fisk for at bestemme fedtindholdet på hvert af de samme tre tidspunkter. Antal fisk pr. tank ved forsøgets start bør tilpasses i overensstemmelse hermed ([1]). Hvis der alternativt ikke påvises betydelige mængder teststof i kontrolfiskene (dvs. fisk fra stampopulationen), kan det være tilstrækkeligt at analysere kontrolfiskene fra testen for fedtindhold, og analysen for teststoffet i testgruppen/-erne (og den dermed forbundne hastighedskonstant, udskillelseskonstant og BCF-værdi(er)) kan korrigeres for ændringer ifølge kontrolgruppens fedtindhold i løbet af testen ([2]).

Døde eller syge fisk bør ikke analyseres for teststof eller fedtkoncentration.

I tillæg 4 er der vist et eksempel på en acceptabel prøveudtagningsplan. Der kan let opstilles andre planer til at beregne eksponeringstider for 95 % optagelse ud fra andre antagne K_{OW}-værdier (der henvises til tillæg 5 for beregninger).

Prøveudtagningen bør fortsættes under optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt (se tillæg 1, definitioner og enheder); ellers afsluttes optagelsesfasen (efter 28 eller 60 dage, jf. punkt 37 og 38). Før udskillelsesfasen bør fiskene overføres til rene kar.

Udtagning og forberedelse af prøver

Der bør udtages vandprøver til analyse, f.eks. ved opsugning gennem et rør af inert materiale fra et sted midt i testkammeret. Hverken filtrering eller centrifugering synes altid at kunne adskille den ikke-biotilgængelige fraktion af teststoffet fra den biotilgængelige. Hvis der anvendes en separationsteknik, bør testrapporten altid indeholde en begrundelse for eller validering af denne på

([1]) Hvis fedtindholdet ikke analyseres i samme fisk som teststoffet, bør fiskene mindst have samme vægt og (hvis relevant) samme køn.

([2]) Dette alternativ er kun gyldigt, hvis fiskene i alle testgrupper holdes i grupper med fisk af ensartet størrelse, samt at de fjernes efter samme mønster og fodres på samme måde. Dette sikrer en ensartet vækst i alle fisketestgrupper, hvis den testede koncentration ligger under grænsen for toksicitet. Hvis væksten er den samme, forventes fedtindholdet også at være det samme. En anden vækst i kontrolgruppen ville være tegn på, at stoffet har haft en effekt, og gøre undersøgelsen ugyldig.

▼M7

grund af vanskelighederne med biotilgængelighed (25). Især for stærkt hydrofobe stoffer (dvs. stoffer med log K_{OW} > 5) (12) (26), hvor der kan opstå adsorption til filtermatricen eller centrifugering i beholdere, bør prøverne ikke gennemgå disse behandlinger. I stedet bør tankene holdes så rene som muligt (jf. punkt 46), og det samlede indhold af organisk kulstof følges under såvel optagelses- som udskillelsesfasen (jf. punkt 53). For at undgå eventuelle problemer med nedsat biotilgængelighed kan der udtages prøver ved hjælp af fastfase-mikroekstraktionsteknikker, hvis stofferne er tungtopløselige og stærkt hydrofobe.

De udtagne fisk bør aflives straks ved hjælp af den mest hensigtsmæssige og humane metode (til målinger af hele fisk skylles de blot i vand og tørres (jf. punkt 28)) Fisken vejes, og den samlede længde måles ([1]). I hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde forbindes med den analyserede stofkoncentration (og fedtindhold, hvis det er relevant), f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagen fisk.

Fiske- og vandprøver skal helst analyseres umiddelbart efter udtagningen, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau (ligevægt) er indtrådt.

Foretages analyserne ikke med det samme, bør prøverne opbevares hensigtsmæssigt. Inden undersøgelsen påbegyndes, indhentes der oplysninger om, hvordan det pågældende teststof bør opbevares, f.eks. dybfrysning, opbevaring ved 4 °C, ekstraktion osv. Det sikres, at teststoffet ikke opbevares så længe, at det nedbrydes under opbevaring.

Analysemetodens kvalitet

Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at analysen af stoffet giver tilfredsstillende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed og genfinding af teststoffet i både vand og fisk for den valgte metode. Dette bør være en del af indledende forsøg. Det kontrolleres tillige, at teststoffet ikke kan påvises i det anvendte fortyndingsvand. Om nødvendigt korrigeres de værdier af teststofkoncentrationer i vand og fisk, der er fundet under testen, for genfinding og baggrundsværdier i kontrollerne. Fiske- og vandprøver behandles hele tiden på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. på grund af adsorption til prøveudtagningsudstyret) mindskes mest muligt.

Analyse af fiskeprøver

Hvis der i testen anvendes radioaktivt mærket materiale, kan man analysere for det samlede indhold af radioaktivitet (dvs. det oprindelige stof og dets metabolitter), eller prøverne kan oprenses, så de oprindelige stof kan analyseres særskilt. Hvis BCF skal baseres på det oprindelige stof, bør de vigtigste metabolitter som minimum karakteriseres ved optagelsesfasens afslutning (jf. punkt 6). De vigtigste metabolitter er dem, som udgør ≥ 10 % af de samlede restkoncentrationer i fiskevæv, som udgør ≥ 5 % ved to på hinanden følgende prøveudtagningspunkter, som udviser et stigende niveau i hele optagelsesfasen, og som er kendetegnet ved kendte toksikologiske betænkeligheder. Hvis BCF for hele fisk udtrykt i samlet radioaktivt mærket restindhold er ≥ 500, kan det være tilrådeligt — og kraftigt tilrådeligt for visse kategorier af stoffer såsom pesticider — at identificere og kvantificere de vigtigste metabolitter. Kvantificering af disse metabolitter kan være et krav fra nogle regulerende myndigheder. Hvis nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af radioaktivt mærket restindhold i alt i fiskevævet,

([1]) Ud over vægt bør den samlede længde registreres, da sammenligning af omfanget af længdeforøgelse i løbet af testen er en god indikator for, om der er indtruffet skadelige virkninger.

▼M7

identificeres og bestemmes kvantitativt, anbefales det at gøre det samme for nedbrydningsprodukter i testvandet. Hvis dette ikke er muligt, bør der redegøres herfor i rapporten.

Normalt bør koncentrationen af teststoffet bestemmes i hver enkelt fisk efter vejning. Hvis dette ikke er muligt, kan prøverne fra hver prøveudtagning pooles, men pooling indskrænker mulighederne for statistisk behandling af dataene; der bør derfor medtages et passende antal fisk i testen, således at den ønskede pooling, statistiske procedure og power opnås. Reference (27) og (28) kan anvendes som en introduktion til relevante poolingprocedurer.

BCF bør udtrykkes som normaliseret i forhold til en fisk med 5 % fedtindhold (baseret på vådvægt) ud over det, der er direkte udledt af undersøgelsen (jf. punkt 21), medmindre det kan fremføres, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtstoffer. Fiskenes fedtindhold bør om muligt bestemmes ved hver prøveudtagning og helst på samme ekstrakt, som er benyttet til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved kromatografi. En analyse af teststoffer kræver dog ofte særlige ekstraktionsprocedurer, som kan være i strid med forsøgsmetoderne til bestemmelse af fedtindhold. I dette tilfælde (indtil der findes egnede, ikke-destruktive instrumentelle metoder) anbefales det at anvende en anden strategi til at bestemme fiskenes fedtindhold (jf. punkt 56). Fedtindholdet bør bestemmes ved hjælp af egnede metoder (20). Teknikken til ekstraktion med chloroform/methanol (29) kan anbefales som standardmetode (30), men Smedes-metoden (31) anbefales som alternativ teknik. Sidstnævnte metode er kendetegnet ved en sammenlignelig ekstraktionseffektivitet, stor nøjagtighed, anvendelse af mindre giftige organiske opløsningsmidler og brugervenlighed. Andre metoder, hvis nøjagtighed svarer til de anbefalede metoders, kan anvendes, hvis det er behørigt begrundet. Det er vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet.

Måling af fiskenes vækst

Ved testens begyndelse skal 5-10 fisk fra stampopulationen vejes enkeltvis, og deres samlede længde måles. Det kan være de samme fisk, der anvendes til analyse af fedtindhold (jf. punkt 56). Vægt og længde af fisk, der bruges til hver prøveudtagning fra både test- og kontrolgrupper, bør måles før kemisk analyse eller analyse af fedtindhold. Målingerne af disse udtagne fisk kan anvendes til at anslå vægten og længden af de fisk, der bliver tilbage i test- og kontroltanke (jf. punkt 45).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Teststoffets optagelseskurve bør fås ved at plotte dets koncentration i/på fiskene (eller bestemt væv) under optagelsesfasen mod tid (lineære akser). Hvis kurven har nået et plateau, dvs. at den er omtrent parallel med tidsaksen, beregnes BCF (BCF_{SS}) i ligevægtstilstand ved hjælp af følgende:

$$\frac{C_f ligevægt(gnsn.)}{C_w ligevægt(gnsn.)}$$

▼M7

Udviklingen af C_f kan påvirkes af fiskenes vækst (jf. punkt 72 og 73). Den gennemsnitlige eksponeringskoncentration (C_W) påvirkes af variationer over tid. Det kan forventes, at en tidsvægtet gennemsnitskoncentration er mere relevant og præcis med henblik på bioakkumuleringsundersøgelser, selv om variationen ligger inden for et passende gyldighedsinterval (jf. punkt 24). En tidsvægtet gennemsnitlig (TWA) vandkoncentration kan beregnes i henhold til tillæg 5, afsnit 1.

Biokoncentreringsfaktoren (BCF_K) beregnes som forholdet $k1/k2$, de to første-ordenskinetiske hastighedskonstanter. Hastighedskonstanterne k_1 og k_2 og BCF_K kan udledes ved samtidig at fitte resultaterne af optagelses- og udskillelsesfasen. Alternativt kan k_1 og k_2 bestemmes fortløbende (se tillæg 5 for en beskrivelse og sammenligning af disse metoder). Hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) skal måske korrigeres for vækstfortynding (jf. punkt 72 og 73). Hvis optagelses- og/eller udskillelseskurven tydeligvis ikke er af første orden, må der tages mere komplekse modeller i brug (se henvisningerne i tillæg 5) og søges bistand fra en biostatistiker eller farmakokinetiker.

Data om fisks vægt/længde

De enkelte fisks vådvægt og samlede længder for alle prøveudtagningsintervaller opstilles i tabelform for test- og kontrolgrupper i optagelses- og udskillelsesfasen (herunder stampopulation for optagelsesfasen). For hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde forbindes med den analyserede kemikaliekoncentration, f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagen fisk. Vægt er det foretrukne mål for vækst med henblik på at korrigere kinetiske BCF-værdier for vækstfortynding (se punkt 73 og tillæg 5 for den metode, der anvendes til at korrigere data for vækstfortynding).

Korrigering for vækstfortynding og lipidnormalisering

Fiskenes vækst i udskillelsesfasen kan sænke målte koncentrationer af kemikalier i fiskene, hvilket betyder, at den samlede udskillelseskonstant (k_2) er større, end den ville have været ved rene fjernelsesprocesser (f.eks. åndedræt, stofskifte eller egestion). Kinetiske biokoncentreringsfaktorer bør korrigeres for vækstfortynding. En BCF_{SS} vil også blive påvirket af vækst, men der findes ingen vedtagen procedure til at korrigere en BCF_{SS} for vækst. I tilfælde af stor vækst bør man også udlede BCF_K korrigeret for vækst (BCF_{Kg}), da denne værdi kan være mere relevant til at måle biokoncentreringsfaktoren. Fedtindholdet i testfiskene (som hænger tæt sammen med bioakkumuleringen af hydrofobe stoffer) kan variere nok i praksis, således at det er nødvendigt at normalisere til et fast fedtindhold (5 % vægt/vægt) for at fremlægge både en kinetisk biokoncentreringsfaktor og en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor på en meningsfuld måde, medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv (f.eks. kan visse perfluorerede stoffer binde til proteiner). Ligninger og eksempler på disse beregninger kan ses i tillæg 5.

For at korrigere en kinetisk BCF for vækstfortynding bør hastighedskonstanten korrigeres for vækst. Denne vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) beregnes ved at trække vækstthastighedskonstanten (k_g fra de målte vægtdata) fra den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2). Den vækstkorrigerede kinetiske biokoncentreringsfaktor beregnes derefter ved at dividere optagelseshastighedskonstanten (k_1) med den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) (jf. tillæg 5). I nogle tilfælde kan denne metode medføre visse risici. For meget langsomt udskilte stoffer, der testes i hurtigtvoksende fisk, kan den afledte k_{2g} f.eks. være meget lille, og dermed bliver fejlprocenten i de to hastighedskonstanter, der er brugt til at beregne den, kritiske, og i nogle tilfælde kan skøn over k_g overstige k_2. I en alternativ tilgang, der omgår behovet for korrigering for vækstfortynding, anvendes udskillelsesdata for teststofmasse pr. fisk

▼M7

(hel) i stedet for de normale (koncentrations)data for teststofmængde pr. enhed fiskemasse. Dette kan nemt opnås, da test i henhold til denne TM bør forbinde registrerede vævskoncentrationer og den enkelte fisks vægt. En enkel procedure hertil er beskrevet i tillæg 5. Bemærk, at k_2 stadig bør rapporteres, også hvis det er den alternative metode, der anvendes.

Den kinetiske biokoncentreringsfaktor og ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren anføres også i forhold til et standardfedtindhold på 5 % (vægt/vægt), medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv. Fiskekoncentrationsdata eller BCF normaliseres ifølge forholdet mellem 5 % og det faktiske gennemsnitlige (individuelle) fedtindhold (i % vådvægt) (jf. tillæg 5).

Hvis samme fisk er blevet analyseret for kemikalier og fedtindhold, bruges normaliserede data for de individuelle fisks fedtindhold til at beregne en lipidnormaliseret BCF. Hvis der alternativt er samme vækst hos kontrolfisk og eksponerede fisk, kan det være tilstrækkeligt kun at anvende fedtindholdet til korrigering for fedtindhold (jf. punkt 56). En metode til beregning af en lipidnormaliseret BCF er beskrevet i tillæg 5.

Fortolkning af resultater

Hvis der i prøveopløsninger måles koncentrationer nær analysemetodens påvisningsgrænse, bør resultaterne fortolkes med forsigtighed.

Gennemsnitlig vækst i både test- og kontrolgrupper bør i princippet, for at udelukke toksiske virkninger, ikke adskille sig væsentligt fra hinanden. Væksthastighedskonstanterne eller vækstkurverne for de to grupper sammenlignes med en passende procedure ([1])).

Skarpe optagelses- og udskillelseskurver er tegn på biokoncentreringsdata af høj kvalitet. For hastighedskonstanterne bør resultatet af en χ^2-egnethedstest vise god egnethed (dvs. en lille målingsfejlprocent (32)) for bioakkumuleringsmodellen, således at hastighedskonstanterne kan betragtes som pålidelige (jf. tillæg 5). Hvis der anvendes mere end en testkoncentration, bør forskellen i optagelses- og udskillelseskonstanter mellem testkoncentrationerne være under 20 % ([2]). Hvis dette ikke er tilfældet, kan der anføres koncentrationsafhængighed. Signifikante forskelle i optagelses-/udskillelseshastighedskonstanter mellem de anvendte testkoncentrationer bør noteres og om muligt forklares. Normalt ligger konfidensgrænserne for BCF-værdier i veltilrettelagte undersøgelser på ± 20 % af den afledte BCF.

Hvis to eller flere koncentrationer testes, bruges resultaterne fra begge eller alle koncentrationer til at undersøge, om resultaterne er konsekvente, og til at vise,

([1]) Der kan foretages en *t*-test på væksthastighedskonstanterne for at undersøge, om der er forskelle i væksten mellem kontrol- og testgrupper, eller en *F*-test i tilfælde af variansanalyse. Der kan om nødvendigt gennemføres en *F*-test eller sandsynlighedskvotienttest som hjælp til at vælge en passende vækstmodel (OECD's monografi 54, (32)).

([2]) Disse procentsatser er baseret på, at analysemetoderne er pålidelige, og at halveringstiden er < 14 dage. Hvis analysemetoderne er mindre pålidelige, eller halveringstiden er (meget) længere, bliver disse tal større.

▼M7

om der er koncentrationsafhængighed. Hvis der kun testes en koncentration for at mindske anvendelsen af dyr og/eller ressourcer, begrundes dette.

Den deraf resulterende BCF_{SS} er tvivlsom, hvis BCF_K-værdien er betydeligt større end BCF_{SS}, da dette kan være en indikation af, at der ikke er indtrådt ligevægt, eller af at der ikke er taget hensyn til vækstfortynding og tabsprocesser. I tilfælde, hvor BCF_{SS} er meget højere end BCF_K, bør udledningen af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse kontrolleres for fejl og revurderes. En anden fitningsprocedure kan forbedre skønnet over BCF_K (jf. tillæg 5).

Testrapport

Bortset fra teststofoplysningerne i punkt 3 skal testrapporten indeholde følgende:

Teststof:

fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— data for kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold)

— for stoffer med flere bestanddele og UVCB (kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer), så vidt muligt en beskrivelse af de enkelte bestanddeles kemiske identitet og for hver enkelt dens procentuelle andel af den samlede stofmasse. Hvordan den analysemetode, der anvendes i testen, afspejler en måling af stoffets koncentration, bør sammenfattes; alle analytiske procedurer bør beskrives, herunder metodens nøjagtighed, metodens detektionsgrænse og kvantificeringsgrænse

— hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder

— oplysninger om teststoffets toksicitet for fisk (helst testarten). Toksiciteten angives som en akut 96-h LC_{50} og en NOAEC & LOAEC fra en længerevarende undersøgelse (dvs. test af tidlige livsstadier eller en fuld livscyklustest, hvis en sådan findes)

— opbevaringsbetingelser for testkemikaliet eller teststoffet og testkemikaliets eller teststoffets stabilitet under opbevaringsbetingelserne, hvis disse opbevares før brug.

Testart:

dens videnskabelige navn, stamme, kilde, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, køn (hvis relevant), størrelse (vægt og længde) osv.

Testbetingelser:

— testprocedure (f.eks. gennemstrømning eller semistatisk), regelmæssig undersøgelse eller begrænset prøve (herunder begrundelse)

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testdesign (f.eks. testkamrenes antal og størrelse, vandudskiftningsinterval, belastning, antal replikater, antal fisk pr. replikat, antal testkoncentrationer, optagelses- og udskillelsesfasens længde samt hyppighed for udtagning af fiske- og vandprøver)

▼M7

— metode til fremstilling af stamopløsninger og fornyelseshyppighed (hvis der benyttes opløsningsmiddel, oplyses dets koncentration og bidrag til testvandets indhold af organisk kulstof) eller beskrivelse af alternativt doseringssystem

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testkarrene, samt hvilken metode og hyppighed der er benyttet til bestemmelsen

— kilde til fortyndingsvand, beskrivelse af en eventuel forbehandling, resultater af forsøg til bekræftelse af, at fiskene kan leve i vandet, og vandets egenskaber: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis relevant) samt alle andre målinger

— kvaliteten af vandet i testkarrene, pH, hårdhed, samlet mængde organisk stof, temperatur og koncentration af opløst ilt, anvendte metoder og hyppighed af målinger

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type, kilde og sammensætning (som minimum fedt- og proteinindhold hvis muligt) samt fodermængde og fodringshyppighed)

— oplysninger om, hvordan fiske- og vandprøver er behandlet, herunder fremstilling, opbevaring, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststof og fedtindhold (hvis bestemt)

— metoder anvendt til behandling, randomisering og fordeling af fisk i testkar

— dato for tilførsel af testorganismer til testopløsninger og testens varighed

— beskrivelse af undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval og resultater, hvis disse forefindes.

Resultater:

— resultater af en eventuel forprøve

— dødelighed for kontrolfiskene og fiskene i hvert enkelt eksponeringskammer samt eventuel observeret unormal adfærd

— oplysninger om eventuelle negative virkninger

— fuldstændig beskrivelse af alle kemiske analyseprocedurer, herunder detektions- og kvantificeringsgrænser samt variation og genfinding

— fedtindholdet i fiskene, herunder den anvendte metode og (hvis beregnet) faktor for normalisering af fedtindhold (L_n, faktor, der udtrykker resultater vedrørende fedtindhold på 5 %)

— i tabelform: data for vægt (og længde) i tilknytning til koncentrationen af kemikalier i de enkelte fisk (og fedtindhold, hvis det er relevant), både for kontrol- og eksponeringsgrupper (f.eks. ved at anvende unikke identifikatorer for hver udtagen fisk) og beregninger for afledte væksthastighedskonstant(er)

▼M7

— i tabelform: data for teststofkoncentration i fisk (C_f, i tilknytning til de enkelte fisk) og vand (C_w) (med middelværdier for test- og kontrolgruppe, standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) for alle prøveudtagningstidspunkter (C_f udtrykt i mg/kg vådvægt af hele fisken eller specificeret væv deraf, f.eks. fedtvæv, og C_w i mg/l) C_W-værdier for kontrolrækker (baggrundsværdier oplyses)

— kurver (og alle målte data), der viser følgende (eventuelle koncentrationer kan udtrykkes både i forhold til hele kroppen og fedtindholdet normaliseret til 5 % af dyret eller specificeret væv deraf):

  — vækst, dvs. fiskens vægt i forhold til tid eller vægt transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til tid (herunder den afledte vækststhastighedskonstant k_g)

  — optagelse og udskillelse af teststoffet i fiskene (på én graf)

  — tiden til ligevægt (hvis indtrådt)

  — koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til optagelsestid (herunder den afledte optagelseshastighedskonstant k_1)

  — koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til udskillelsestid (herunder den afledte udskillelseshastighedskonstant k_1) og

  — kurver for både optagelses- og udskillelsesfasen, der viser data og den fittede model

— hvis en visuel undersøgelse af en kurve viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades

— ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}), hvis der (næsten) er indtrådt ligevægt

— den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_K) og de deraf afledt optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter k_1 og k_2 sammen med varianser i k_2 (hældning og skæringspunkt), hvis der anvendes sekventiel fitning

— konfidensgrænser, standardafvigelse (hvis en sådan forefindes) og metoder til beregning/dataanalyse for hver parameter for hver koncentration af det anvendte teststof

  — oplysninger om radioaktivt mærket prøvestof, metabolitter og akkumulering deraf

  — vækststhastighedskonstant(er) (herunder konfidensinterval(ler) på 95 %) og beregnet vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}), halveringstid og BCF-værdier (BCF_{Kg})

  — alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger

  — en sammenfattende oversigt over relevante målte og beregnede data som følger:

▼M7

Stoffers optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter og biokoncentreringsfaktorer (BCF)	
k_g (vækshastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
k_1 (samlet optagelseshastighedskonstant, $l\ kg^{-1}\ dag^{-1}$):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
k_2 (samlet udskillelseshastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
k_{2g} (vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
C_f (koncentration af kemikalie i fiskene ved ligevægt, $mg\ kg^{-1}$):	Indsæt værdi ± SD (2)
C_w (koncentration af kemikalie i vand, $mg\ l^{-1}$).	Indsæt værdi ± SD (2)
L_n (lipidnormaliseringsfaktor):	Indsæt værdi (3)
BCF_{SS} (ligevægt BCF, $l\ kg^{-1}$)	Indsæt værdi ± SD (2)
BCF_{SSL} (lipidnormaliseret ligevægts-BCF, $l\ kg^{-1}$):	Indsæt værdi (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetisk BCF, $l\ kg^{-1}$)	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (vækstkorrigeret kinetisk BCF, $l\ kg^{-1}$)	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
$T_{1/2G}$ (vækstkorrigeret halveringstid, dag):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (lipidnormaliseret kinetisk BCF, $l\ kg^{-1}$):	Indsæt værdi
BCF_{KL} (lipidnormaliseret vækstkorrigeret kinetisk BCF, $l\ kg^{-1}$):	Indsæt værdi

(1) CI: konfidensinterval (hvor det er muligt at anslå).
(2) SD: standardafvigelse (hvor det er muligt at anslå).

Resultater, der rapporteres som »ikke påvist/kvantificeret ved påvisnings-/kvantificeringsgrænsen« ved udvikling af forprøve og forsøgsdesign bør undgås, da sådanne resultater ikke kan benyttes til beregning af hastighedskonstanter.

C.13 — II: **BEGRÆNSET TEST MED EKSPONERING AF FISK I VAND**

INDLEDNING

Den stigende erfaring med at gennemføre og fortolke den komplette test, både hos laboratorier og tilsynsmyndigheder, viser, at førsteordenskinetik — med nogle få undtagelser — anvendes til at skønne optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter. Optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter kan anslås med et minimum af prøveudtagningspunkter, hvorefter den kinetiske BCF kan beregnes.

Det oprindelige formål med at undersøge alternative design for BCF-undersøgelser var at udvikle en lille test, der skal anvendes i et mellemliggende testtrin med henblik på at afvise eller bekræfte BCF-skøn baseret på K_{OW} og QSAR og dermed fjerne behovet for en komplet test af mange stoffer samt minimere omkostningerne og antallet af forsøgsdyr ved at reducere antallet af prøveudtagninger og analytiske sekvenser. Den primære design for den foregående forsøgsmetode sigter mod at gøre det muligt at integrere testresultater i eksisterende BCF-data og lette udførelsen af test og datafortolkning og samtidig formidle tilstrækkeligt nøjagtige og præcise BCF-skøn med henblik på afgørelser

▼M7

om risikovurdering. Mange af de samme overvejelser som ved den komplette test er gældende, f.eks. validitetskriterier (jf. punkt 24) og afslutning af en prøve, hvis der konstateres ubetydelig optagelse ved denne fases afslutning (jf. punkt 16 og 38).

Stoffer, som ville kunne indgå i det begrænsede testdesign, bør henhøre under det generelle område, som denne forsøgsmetode er udviklet til, dvs. ikkepolære organiske stoffer (jf. punkt 49). Hvis der er tegn på, at det stof, der skal testes, kan udvise en anden adfærd (f.eks. en klar afvigelse fra førsteordenskinetik), bør der foretages en komplet test i tilsynsøjemed.

Den begrænsede test udføres typisk ikke over en kortere periode end BCF-standardtesten, men omfatter færre udtagninger af fiskeprøver (se tillæg 6 for begrundelsen). Udskillelsesperioden kan dog afkortes for stoffer, der udskilles hurtigt, for at undgå, at koncentrationerne i fiskene falder til under detektions-/kvantificeringsgrænsen før prøvens afslutning. En begrænset test for eksponering af fisk med en enkelt koncentration kan bruges til at afgøre, om der er behov for en komplet test, og hvis de deraf resulterende data, som bruges til at beregne hastighedskonstanterne og BCF, er robuste (jf. punkt 93), kan man undlade at gennemføre en komplet test, hvis den resulterende BCF ikke nødvendiggør forskrifter.

I nogle tilfælde kan det være en fordel at foretage den begrænsede test med mere end en koncentration som en foreløbig test for at fastslå, om BCF-skøn for et stof er koncentrationsafhængige. Hvis BCF-skønnene fra den begrænsede test viser koncentrationsafhængighed, er det nødvendigt at foretage en komplet test. Hvis BCF-skønnene på grundlag af en sådan begrænset test viser sig ikke at være koncentrationsafhængige, men resultaterne ikke betragtes som endelige, kan eventuelle efterfølgende komplette test udføres med en enkelt koncentration, hvilket vil reducere brugen af dyr sammenlignet med en komplet test med to (eller flere) koncentrationer.

Stoffer, der potentielt kan anvendes i den begrænsede test, bør:

— med en vis sandsynlighed udvise omtrentlig optagelses- og udskillelseskinetik af første orden, f.eks. udledt ved analogislutning med lignende stoffer

— have en log K_{ow} < 6, medmindre der forventes en hurtig metabolisme [1].

— være tilstrækkeligt vandopløselige med hensyn til den analytiske teknik (jf. punkt 24)

— være klart kvantificerbare (dvs. at koncentrationer mindst bør ligge en størrelsesorden over kvantificeringsgrænsen), både i fisk og vand, radioaktiv mærkning anbefales (jf. punkt 23)

— have en udskillelsesperiode, der er længere end stoffets forventede halveringstid (jf. tillæg 5 vedrørende beregninger), eller udskillelsesfasens længde bør tilpasses i overensstemmelse hermed (jf. punkt 91). En undtagelse fra denne regel er tilladt, hvis der forventes hurtig metabolisme af stoffet.

[1] Den begrænsede test kan faktisk bruges til at påvise hurtig metabolisme, når det er kendt, at hurtig metabolisme er sandsynlig.

▼M7

PRØVEUDTAGNINGSPLAN FOR BEGRÆNSEDE UNDERSØGELSER

Udtagning af fiskeprøver

Udtagningen af fiskeprøver er reduceret til fire prøveudtagningspunkter:

— i midten og slutningen af optagelsesfasen (sidstnævnte svarer desuden til udskillelsesfasens begyndelse), f.eks. efter 14 og 28 dage (33).

— i midten af udskillelsesfasen og ved undersøgelsens afslutning (hvor stoffets koncentration er < 10 % af den maksimale koncentration, eller i det mindste har passeret en halveringstid for stoffet), f.eks. 7 og 14 dage efter udskillelse (33). Hvis der forventes eller observeres hurtig udskillelse, kan det være nødvendigt at afkorte udskillelsesperioden for at undgå, at koncentrationerne i fiskene falder til under kvantificeringsgrænsen

— måling af fedtindhold som i en komplet test

— korrigering for vækst som i en komplet test.

— BCF beregnes som en kinetisk BCF.

Udtagning af vandprøver

For begrænsede test udtages der stikprøver af vand som i en komplet test (jf. punkt 54) eller mindst fem gange jævnt fordelt over optagelsesfasen og ugentligt i udskillelsesfasen.

Ændringer af testdesign

Under hensyntagen til teststoffets egenskaber, gyldige QSAR-forudsigelser og med undersøgelsens specifikke formål kan visse ændringer i undersøgelsens design tages i betragtning:

— Hvis der er behov for større præcision, kan der anvendes flere fisk (6 eller 8 i stedet for 4) til prøven ved optagelsesfasens slutning.

— Medtagelse af en »ekstra« gruppe fisk, hvis udskillelse efter 14 dage (eller ved udskillelsesfasens forventede afslutning) ikke har været tilstrækkelig til at sikre en passende udskillelse (dvs. > 50 %). Hvis den forventede udskillelsesfase er over eller under 14 dage, tilpasses prøveudtagningsplanen (dvs. en gruppe af fisk ved udskillelsesfasens forventede afslutning og en gruppe efter halvdelen af denne fase).

— Brug af to testkoncentrationer for at undersøge mulig koncentrationsafhængighed. Hvis resultaterne af den begrænsede test udført med to testkoncentrationer viser, at BCF er ikke koncentrationsafhængig (dvs. afviger under 20 %), kan en testkoncentration anses for at være tilstrækkelig i en komplet test, hvis en sådan gennemføres.

— Det forekommer sandsynligt, at modeller for bioakkumuleringsprocesser som foreslået af Arnot et al. (35) kan anvendes som en hjælp til planlægningen af optagelses- og udskillelsesfasens længde (se også tillæg 5).

Beregninger

Begrundelsen for denne fremgangsmåde er, at biokoncentreringsfaktoren i en komplet test enten kan bestemmes som en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{SS}) ved at beregne forholdet mellem teststoffets koncentration i fiskenes væv og i vand, eller ved at beregne den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_K) som forholdet mellem optagelseshastighedskonstanten k_1 og udskillelseshastighedskonstanten k_2. BCF_K er gyldig, selv om et stofs ligevægtskoncentration

▼M7

ikke opnås under optagelsesfasen, forudsat at optagelse og udskillelse omtrent fungerer i henhold til kinetiske processer af første orden. Som et absolut minimum skal der være to datapunkter til at anslå optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter, et ved optagelsesfasens afslutning (dvs. ved udskillelsesfasens begyndelse) og et ved udskillelsesfasens afslutning (eller efter en stor del af den). Det anbefales at bruge det mellemste prøveudtagningspunkt til at kontrollere optagelses- og udskillelseskinetikken ([1]). Der henvises til tillæg 5 og 6 for beregninger.

Fortolkning af resultaterne

For at vurdere testens gyldighed og informationsværdi kontrolleres det, at udskillelsesperioden overstiger en halveringstid. Desuden bør BCF_{Km} (kinetisk BCF beregnet ud fra en begrænset test) sammenlignes med den begrænsede BCF_{SS}-værdi (der er BCF_{SS} beregnet ved optagelsesfasens afslutning, idet det forudsættes, at ligevægt er indtrådt. Dette kan kun være et skøn, da der ikke er tilstrækkeligt mange prøveudtagningspunkter til at dokumentere dette). Hvis BCF_{Km} < minimeret BCF_{SS}, bør den minimerede BCF_{SS} være den foretrukne værdi. Hvis BCF_{Km} er under 70 % af den minimerede BCF_{SS}, er resultaterne ikke gyldige, og der bør foretages en komplet test.

Hvis den begrænsede test giver et BCF_{Km} i nærheden af en værdi, der nødvendiggør forskrifter, bør der gennemføres en komplet test. Hvis resultatet er langt fra at nødvendiggøre forskrifter (værdien ligger langt over eller under det niveau, der nødvendiggør forskrifter), er en komplet test måske ikke nødvendig, eller der kan gennemføres en enkelt komplet test, hvis dette kræves i henhold til den relevante lovgivning.

Hvis en komplet test er nødvendig efter en begrænset test med en koncentration, kan denne udføres ved en anden koncentration. Hvis resultaterne er konsekvente, kan man afstå fra at gennemføre en yderligere test ved en anden koncentration, da stoffets biokoncentrering ikke forventes at være koncentrationsafhængig. Hvis den begrænsede test er foretaget ved to koncentrationer, og resultaterne viser, at der ikke er koncentrationsafhængighed, kan den komplette test gennemføres med kun en koncentration (jf. punkt 87).

Testrapport

Testrapporten om den begrænsede test bør indeholde alle de oplysninger, der kræves for den komplette test (jf. punkt 81), med undtagelse af oplysninger, det ikke er muligt at udarbejde (dvs. en kurve, der viser tiden indtil ligevægt, og ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren; for sidstnævnte anføres den minimerede BCF_{SS} i stedet). Endvidere bør den også indeholde begrundelsen for at bruge den begrænsede test og den deraf følgende BCF_{Km}.

C.13 — III: **TEST AF BIOAKKUMULERING VED EKSPONERING AF FISK FOR TESTSTOF I FØDE**

INDLEDNING

Den metode, der er beskrevet i dette afsnit, bør anvendes for stoffer, hvor metoden med eksponering i vand ikke kan gennemføres (f.eks. fordi det ikke er muligt at opretholde stabile, målbare koncentrationer i vand, eller fordi passende belastninger ikke kan nås inden for 60 dage efter eksponering. Se foregående afsnit om metoden til eksponering i vand). Det bør dog bemærkes, at endepunktet fra denne test er en biomagnificeringsfaktor ved eksponering i føde (BMF) og ikke en biokoncentreringsfaktor (BCF) ([2]).

I maj 2001 blev en ny metode til test af bioakkumulering af tungtopløselige organiske stoffer præsenteret på SETAC Europe-konferencen, der fandt sted i

([1]) Når der kun måles to datapunkter, kan der foretages skøn over konfidensgrænserne for BCF_{Km} ved hjælp af bootstrap-metoder. Når der også er mellemliggende datapunkter, kan konfidensgrænserne for BCF_{Km} beregnes som i en komplet test.

([2]) Se tillæg 1 for definitioner og enheder.

▼M7

Madrid (36). Dette arbejde bygger på forskellige bioakkumuleringsundersøgelser i litteraturen, hvor der er anvendt en doseringsmetode, som omfatter spiked foder (f.eks. (37)). I begyndelsen af 2004 fik en EU-PBT-arbejdsgruppe forelagt et udkast til en protokol (38) om måling af bioakkumuleringspotentialet for tungtopløselige organiske stoffer, som den almindelige biokoncentreringsmetode med eksponering i vand ikke kan anvendes på, sammen med et baggrundsdokument (39). En yderligere begrundelse for metoden var, at den potentielle miljømæssige eksponering for så tungtopløselige stoffer (dvs. log K_{OW} >5) i vid udstrækning kan ske i føden (jf. (40) (41) (42) (43) (44)). Af denne grund henvises der til test af eksponering i føde i nogle forordninger om kemikalier [1]. Det skal dog bemærkes, at eksponering i vandfasen omhyggeligt undgås i den metode, der er beskrevet her, og en BMF-værdi fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes med en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Denne del af denne forsøgsmetoden er baseret på denne protokol (38) og er en ny metode, som ikke er med i den tidligere udgave af TM C.13. Denne alternative test gør det muligt direkte at undersøge eksponering i føde under kontrollerede laboratorieforhold.

Potentielle forskere henvises til pkt. 1 til 14 i denne forsøgsmetode for oplysninger om, hvornår testen med eksponering i føde foretrækkes frem for test med eksponering i vand. Det tilrådes at læse disse overvejelser om forskellige stoffer, før en test gennemføres.

Brug af radioaktivt mærkede teststoffer kan gøres til genstand for de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand (jf. punkt 6 og 65).

Metoden med eksponering i føde kan bruges til at teste mere end et stof i en enkelt test, så længe visse kriterier er opfyldt; disse uddybes i punkt 112. For nemheds skyld beskrives her en forsøgsmetode, hvor der kun er anvendt et teststof.

Testen med eksponering i føde svarer i mange henseender til testen med eksponering i vand, idet den indlysende undtagelse er eksponeringsvejen. Mange aspekter af den her beskrevne metode overlapper derfor med metoden med eksponering i vand, der er beskrevet i det foregående afsnit. Der er krydshenvist til relevante punkter i det foregående afsnit, i det omfang det er muligt, men af hensyn til læsbarheden og forståelsen er en vis overlapning uundgåelig.

PRINCIP FOR TESTEN

Gennemstrømningsbetingelser eller semistatiske betingelser kan anvendes (jf. punkt 4); gennemstrømningsbetingelser anbefales for at begrænse den potentielle eksponering for teststoffet i vand som følge af desorption fra spiked foder eller fæces. Testen består af to faser: optagelse (foder spiked med teststof) og udskillelse (rent, ubehandlet foder) (jf. punkt 16). I optagelsesfasen fodres en »testgruppe« af fisk dagligt med en forudfastlagt kost bestående af almindeligt fiskefoder med en kendt sammensætning, der er spiked med teststoffet. Fiskene bør

[1] I forbindelse med anvendelsen af forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) (EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1) behandles dette spørgsmål i vejledningen om oplysningskrav og kemikaliesikkerhedsvurderinger, kapitel R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1, og figur R7.10-2.

▼M7

ideelt set indtage alt foderet (jf. punkt 141). Fiskene fodres derefter med det rene, ubehandlede, almindelige fiskefoder i udskillelsesfasen. Som med metoden med eksponering i vand kan der anvendes mere end en testgruppe spiked med forskellige teststofkoncentrationer, hvis det er nødvendigt, men en gruppe er tilstrækkeligt for de fleste meget hydrofobe organiske teststoffer (jf. punkt 49 og 107). Hvis der anvendes semistatiske betingelser, bør fiskene overføres til et nyt medium og/eller et nyt testkammer ved optagelsesfasens afslutning (hvis det medium og/eller apparat, der anvendes i eksponeringsfasen, har været forurenet med prøvestoffet på grund af udvaskning). Koncentrationerne af teststoffet i fiskene måles i begge testfaser. Ud over den fiskegruppe, der har fået spiked føde (testgruppen), skal der være en kontrolgruppe af fisk, som lever under identiske betingelser og fodres på samme måde, bortset fra at det kommercielle fiskefoder ikke er spiked med teststof. Denne kontrolgruppe gør det muligt at kvantificere teststoffets baggrundsværdier i ueksponerede fisk og tjener som sammenligningsgrundlag for eventuelle behandlingsrelaterede skadelige virkninger i testgruppen(-erne) ([1]). Samtidig bliver det muligt at sammenligne vækst-hastighedskonstanter mellem grupper for at kontrollere, at fiskene har ædt samme mængder foder (potentielle forskelle i forskelligt foders smag bør også indgå i forklaringerne på forskelle i hastighedskonstanter for vækst, jf. punkt 138). Det er vigtigt, at test- og kontrolgrupperne får foder med samme næringsværdi under både optagelses- og udskillelsesfasen.

Det er på baggrund af erfaringer fra metodeudviklere påvist, at en optagelsesfase på 7-14 dage normalt er tilstrækkeligt (38) (39); dette burde mindske omkostningerne ved testen og samtidig sikre tilstrækkelig eksponering for de fleste stoffer. I nogle tilfælde kan optagelsesfasen dog forlænges (jf. punkt 127). Under optagelsesfasen når stofkoncentrationen i fiskene ikke nødvendigvis op på ligevægt, hvorfor databehandling og resultater fra denne metode normalt er baseret på en kinetisk analyse af restkoncentrationer i væv. (Bemærkning: Ligninger for skøn over tid indtil ligevægt kan anvendes her som ved testen med eksponering i vand — se tillæg 5). Udskillelsesfasen begynder, når fiskene første gang fodres med foder uden teststof, og varer typisk i op til 28 dage, eller indtil teststoffet ikke længere kan kvantificeres i hele fisk, idet det først indtrufne gælder. Udskillelsesfasen kan forkortes eller forlænges ud over 28 dage afhængigt af ændringer over tid i målte kemiske koncentrationer og fiskenes størrelse.

Denne metode gør det muligt at bestemme den stofspecifikke halveringstid ($t_{1/2}$, fra hastighedskonstanten for udskillelse k_2), assimileringseffektiviteten (absorption i tarmene, a), den kinetiske fødebiomagnificeringsfaktor (BMFK), den vækstkorrigerede kinetiske biomagnificeringsfaktor i føde (BMFKg) og den lipidkorrigerede ([2]) kinetiske biomagnificeringsfaktor i føde (BMFKL) (og/eller den vækst- og lipidkorrigerede kinetiske fødebiomagnificeringsfaktor (BMF_{KgL}) for teststoffet i fisk. Med hensyn til metoden med eksponering i vand vil stigningen i fiskemasse i løbet af testen medføre en fortynding af teststoffet i voksende fisk, og dermed bliver (kinetisk) BCF undervurderet, hvis der ikke korrigeres for vækst (jf. punkt 162 og 163). Hvis det skønnes, at ligevægt er indtrådt i optagelsesfasen, kan man beregne en vejledende ligevægts-BMF. Der findes metoder, som gør det muligt at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_K) fra data, der er genereret i fodringsundersøgelsen (f.eks. (44) (45) (46) (47) (48). Fordele og ulemper ved sådanne metoder er beskrevet i tillæg 8.

([1]) For de fleste teststoffer bør der ideelt set ikke konstateres teststofkoncentrationer i kontrolvandet. Baggrundskoncentrationer bør kun være relevante for naturligt forekommende materialer (f.eks. visse metaller) og stoffer, der findes overalt i miljøet.

([2]) Da BMF er defineret som forholdet mellem et stofs koncentration i en organisme og koncentrationen i organismens foder ved ligevægt, tages der hensyn til fedtstof ved at korrigere for fedtstofindholdet i organismen og foderet, hvorfor det beskrives mere præcist som en »korrektion«. Denne tilgang adskiller sig fra »normalisering« til et fast fedtindhold i organismen, som det gøres i biokoncentreringstesten med eksponering i vand.

▼M7

Testen er primært tilrettelagt med henblik på tungtopløselige ikke-polære organiske stoffer, der i det store og hele følger optagelses- og udskillelseskinetik af første orden i fisk. Hvis et stof testes og ikke i alt væsentligt følger optagelses- og udskillelseskinetik af første orden, bør der tages mere komplekse modeller i brug (se henvisningerne i tillæg 5) og søges bistand fra en biostatistiker eller farmakokinetiker.

BMF bestemmes normalt ved hjælp af en teststofanalyse af hele fisk (vådvægt). Hvis det er relevant for undersøgelsens formål, kan der udtages prøver af specifikt væv (f.eks. muskler eller lever), hvis fiskene er inddelt i spiselige og ikke-spiselige dele (jf. punkt 21). Man kan desuden fjerne og efterfølgende særskilt analysere mave-tarm-kanalen for at bestemme bidraget til koncentrationer i hele fisk for prøveudtagninger ved optagelsesfasens afslutning og tæt ved udskillelsesfasens begyndelse eller som en del af en massebalancemetode.

Fedtindholdet i udtagne, hele fisk bør måles, således at koncentrationerne kan korrigeres for fedtindhold, idet der tages hensyn til fedtindholdet i både foderet og fiskene (jf. punkt 56 og 57 og bilag 7).

De prøveudtagne fisks vægt bør måles og registreres og knyttes til det analyserede stofs koncentration for den enkelte udtagne fisk (f.eks. rapporteret ved hjælp af en unik kode for hver fisk i stikprøven) med henblik på beregning af fiskenes vækst under testen. Fiskens samlede længde bør også måles, hvor det er muligt ([1]). Vægtdata er også nødvendige for at anslå BCF; her anvendes udskillelsesdataene fra foderet.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Oplysninger om teststoffet bør foreligge, jf. beskrivelse i punkt 3 og 22. En analytisk metode for koncentrationer af teststof i vand er normalt ikke nødvendig; der er behov for metoder med tilstrækkelig følsomhed til at måle koncentrationer i fiskefoder og fiskevæv.

Metoden kan anvendes til at teste mere end et stof i en enkelt test. Teststofferne bør dog være forenelige med hinanden, så de ikke interagerer eller ændrer deres kemiske identitet, efter at de er blevet tilsat fiskefoder. Sigtet er, at de målte resultater for hvert stof, der testes sammen, ikke bør afvige væsentligt fra de resultater, der ville være fremkommet, hvis der var foretaget individuelle test for hvert teststof. Det bør gennem indledende analytisk arbejde fastslås, at hvert stof kan genfindes i en prøve af foder spiked med flere teststoffer og af fiskevæv med i) høj genfinding (f.eks. > 85 % af de nominelle værdier) og ii) den følsomhed, der kræves til test. Den samlede dosis af testede stoffer bør ligge under den kombinerede koncentration, der kan forårsage toksiske virkninger (jf. punkt 51). Desuden bør der i tilrettelæggelsen af testen tages hensyn til eventuelle skadelige virkninger i fisk og potentialet for interaktive virkninger (f.eks. metaboliske virkninger) i forbindelse med samtidig test af flere stoffer. Samtidig test af ioniserbare stoffer bør undgås. I henseende til eksponering er metoden også velegnet til komplekse blandinger (jf. punkt 13, selv om der her gælder samme analysemæssige begrænsninger som for enhver anden metode).

TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testen betragtes som gyldig (jf. punkt 24):

— Vandtemperaturudsvingene skal være under ± 2 °C i behandlings- eller kontrolgrupper.

([1]) Den samlede længde bør også registreres i løbet af testen, da den er en god indikator for, om der er opstået skadelige virkninger.

▼M7

— Koncentrationen af opløst ilt må ikke falde til under 60 % af luftens mætning.

— Koncentrationen af teststoffet i fiskefoder før og ved afslutningen af optagelsesfasen må højst afvige med ± 20 % (baseret på mindst tre prøver taget på begge tidspunkter).

— Der bør i indledende analyser af foder spiked med teststof påvises en høj grad af ensartethed af stoffet — mindst tre koncentrationer for det stof, der udtages ved testens start, må ikke afvige mere end ± 15 % fra gennemsnittet.

— Koncentrationer af teststoffet registreres ikke, eller er kun til stede i typiske spormængder, i foder uden teststof eller væv fra kontrolfisk vedrørende behandlede stikprøver.

— Dødelighed og andre skadevirkninger/sygdomme i både kontrol- og testgruppen bør være ≤ 10 % ved testens afslutning; forlænges testen af en eller anden grund, er skadevirkningerne i begge grupper ≤ 5 % pr. måned og ≤ 30 % kumulativt. Væsentlige forskelle i gennemsnitlig vækst mellem testen og kontrolgrupperne af udtagne fisk kan være et tegn på, at testkemikaliet har en toksisk virkning.

REFERENCESTOFFER

Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør, forskellige fiskearter, betydelige ændringer i fiskenes størrelse, fiskefoder eller spikingmetode), anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence, idet der her anvendes et referencestof. Referencestoffet bruges primært til at fastslå, om spikingteknikken er tilstrækkelig til at sikre maksimal ensartethed og biotilgængelighed af teststoffer. Et stof, der er blevet anvendt i forbindelse med ikke-polære hydrofobe stoffer, er hexachlorbenzen (HCB), men andre stoffer, hvorom der findes pålidelige data om optagelses- og biomagnificering, bør tages i betragtning på grund af HCB's farlige egenskaber ([1]). Hvis der anvendes et referencestof, bør grundlæggende oplysninger herom medtages i testrapporten, herunder betegnelse, renhed, CAS-nummer, struktur, toksicitetsdata (hvis sådanne findes), på samme måde som for teststoffer (jf. punkt 3 og 22).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Materialer og apparater bør anvendes som beskrevet i metoden til eksponering i vand (jf. punkt 26). Der bør anvendes statiske udskiftnings- eller gennemstrømningssystemer, som giver en tilstrækkelig mængde fortyndingsvand i testtankene. Flowhastighederne bør registreres.

Vand

Testvand bør anvendes som beskrevet i metoden til eksponering i vand (jf. punkt 27-29). Testmediet bør karakteriseres som beskrevet, og dets kvalitet bør forblive konstant under testen. Det naturlige partikelindhold og det samlede indhold af organisk kulstof bør være så lavt som muligt (≤ 5 mg/l partikler, ≤ 2 mg/l total organisk kulstof) før testens start. TOC skal kun måles før testen som led i beskrivelsen af testvandet (jf. punkt 53).

([1]) HCB er opført i bilag A og C til Stockholm-konventionen og i bilag I og III til forordning (EF) nr. 850/2004 om persistente organiske miljøgifte (EUT L 158 af 30.4.2004, s. 7).

▼M7

Føde

Et kommercielt tilgængeligt fiskefoder (flydende og/eller langsomt synkende piller), der som minimum er karakteriseret i henseende til protein- og fedtindhold, anbefales. Foderet bør have en ensartet pillestørrelse for at øge effektiviteten af eksponeringen for foderet, dvs. at fiskene vil spise mere af foderet i stedet for at spise de større stykker og lade de mindre ligge. Pillernes størrelse bør være tilpasset fiskenes størrelse ved testens start (der kan f.eks. anvendes en diameter på ca. 0,6-0,85 mm for fisk med en samlet længde på mellem 3 og 7 cm og 0,85-1,2 mm for fisk med en samlet længde på mellem 6 og 12 cm). Pillestørrelsen kan tilpasses efter fiskenes vækst i starten af udskillelsesfasen. Et eksempel på en egnet fodersammensætning, som findes i handlen, kan ses i tillæg 7. Testfoder med et samlet fedtindhold på 15-20 % (vægt/vægt) er normalt blevet anvendt i udviklingen af denne metode. Fiskefoder med en så høj fedtkoncentration kan muligvis ikke fås i visse regioner. I så fald kan casestudierne gennemføres med foder med en lavere fedtkoncentration, og fodermængden kan om nødvendigt tilpasses for at opretholde fiskenes sundhedstilstand (baseret på indledende test). Det samlede fedtindhold i test- og kontrolgruppens føde skal måles og registreres inden testens start og ved optagelsesfasens afslutning. Oplysninger fra leverandøren af det kommercielle foder om analyser af næringsstoffer, vand, fibre og aske samt om muligt mineraler og pesticidrester (f.eks. prioriterede forurenende »standardstoffer«) bør indgå i forsøgsrapporten.

Når foderet spikes med teststof, bør der gøres alt for at sikre, at testfoderet er ensartet. Koncentrationen af teststof i testgruppens foder bør vælges ud fra analyseteknikkens følsomhed, teststoffets toksicitet (nul-effekt-koncentrations-data, NOEC, hvis disse foreligger) og relevante fysisk-kemiske data. Hvis der anvendes referencestof, anbefales det at tilsætte det ved en koncentration på ca. 10 % af teststoffets (eller i hvert fald så lav koncentration som muligt), med forbehold af analysefølsomhed (f.eks. er en koncentration i foderet på 1-100 μg/g blevet accepteret for hexachlorbenzen, jf. (47) for yderligere oplysninger om HCB's assimileringseffektivitet).

Teststoffet kan spikes til fiskefoderet på flere måder afhængigt af dets fysiske egenskaber og opløselighed (jf. tillæg 7 for yderligere oplysninger om tilsætningsmetoder):

— Hvis stoffet er opløseligt og stabilt i triglycerider, bør det opløses i en lille mængde fiskeolie eller vegetabilsk spiseolie, inden det blandes i fiskefoderet. I dette tilfælde bør det undgås at lave en ration med højt fedtindhold, idet der skal tages hensyn til det naturlige fedtindhold i det foder, der spikes med teststof. Der tilsættes derfor den minimale, kendte mængde olie, som er nødvendig for at fordele teststoffet og sikre homogenitet i foderet.

— Foderet bør spikes med et egnet organisk opløsningsmiddel, så længe dette ikke udgør en risiko for homogenitet og biotilgængelighed (der kan muligvis dannes (mikro)krystaller af prøvestoffet i foderet som følge af fordampning af opløsningsmidlet, og der findes ikke nogen let måde at påvise, at dette ikke har fundet sted, jf. (49)).

— Ikke-viskøse væsker tilsættes direkte til fiskefoder, men de bør være godt opblandede for at fremme homogenitet og god assimilering. Blandingsteknikken bør sikre homogenitet i det spikede foder.

▼M7

I nogle få tilfælde, f.eks. med mindre hydrofobe stoffer, der er mere tilbøjelige til at desorbere fra foderet, kan det være nødvendigt at hælde en smule majs-/fiskeolie på foderpillerne (jf. punkt 142). I sådanne tilfælde bør kontrolfoderet behandles på samme måde og den færdige foderblanding bruges til måling af fedtindhold.

Hvis resultaterne af referencestoffet anvendes, bør de være sammenlignelige med data fra undersøgelser gennemført under samme forhold og med en sammenlignelig fodermængde (jf. punkt 45), og stofspecifikke referenceparametre bør opfylde de relevante kriterier i punkt 113 (3., 4. og 5. punkt).

Hvis et olie- eller bærestofopløsningsmiddel anvendes som bærestof for teststoffet, bør en tilsvarende mængde af samme bærestof (uden teststof) iblandes kontrolfoderet for at sikre, at det fortsat svarer til det spikede foder. Det er vigtigt, at test- og kontrolgrupperne får foder med samme næringsværdi under både optagelses- og udskillelsesfasen.

Det spikede foder bør opbevares under sådanne forhold, at teststoffets stabilitet i foderblandingen bevares (f.eks. på køl), og disse betingelser bør rapporteres.

Valg af fiskeart

Fiskearter specificeret for eksponering i vand kan anvendes (jf. punkt 32 og tillæg 3). Regnbueørred (*Oncorhynchus mykiss*), karpe (*Cyprinus carpio*) og tykhovedet elritse (*Pimephales promelas*) har været almindeligt anvendt i undersøgelser om bioakkumulering med organiske stoffer før offentliggørelsen af denne TM. Den valgte testart bør have en fodringsadfærd, der resulterer i hurtigt indtag af den indgivne foderration, for at sikre, at alle faktorer, der påvirker koncentrationen af teststoffet i foder (f.eks. udvaskning i vandet og muligheden af eksponering i vand) holdes på et minimum. Der bør anvendes fisk af den anbefalede størrelse/vægt (jf. tillæg 3). Fiskene bør ikke være så små, at de vanskeliggør analyser baseret på den enkelte fisk. Arter, der testes i fuld livscyklus med hurtig vækst, kan komplicere fortolkningen af data, og høje vækstrater kan påvirke beregningen af assimileringseffektiviteten [1].

Opbevaring af fiskene

Acceptkriterierne for akklimatisering, dødelighed og sygdom er de samme som for metoden med eksponering i vand forud for testens gennemførelse (jf. punkt 33-35).

TESTENS UDFØRELSE

Forundersøgelse og prøve til bestemmelse af dosisinterval

Analytiske forundersøgelser er nødvendige for at påvise genfinding af stoffet i spiked foder/fiskevæv. Det er ikke altid nødvendigt at foretage en forprøve for at vælge en passende koncentration i foderet. Som dokumentation for at der ikke er observeret skadelige virkninger, og for at evaluere det spikede foders smag, analysemetodens følsomhed i forhold til fiskevæv og foder samt valg af egnet fodrings- og prøveudtagningsplan under udskillelsesfasen osv., kan der foretages indledende fodringsforsøg, men det er ikke obligatorisk. En forundersøgelse kan være en god idé til at anslå, hvor mange fisk der skal udtages til prøve i

[1] Hvis væksten sker hurtigt i løbet af optagelsesfasen, vil den reelle fodring falde til under det, der er fastsat ved eksponeringens begyndelse.

▼M7

udskillelsesfasen. Dette kan resultere i en betydelig reduktion i antallet af anvendte fisk, især for teststoffer, der er særligt følsomme over for metabolisme.

Eksponeringsbetingelser

Optagelsesfasens længde

En optagelsesfase på 7-14 dage er normalt tilstrækkeligt. Her fodres en gruppe fisk med kontrolfoder, en anden gruppe fisk får testfoderet dagligt i faste rationer afhængigt af den testede art og forsøgsbetingelserne, f.eks. mellem 1-2 % af kropsvægten (vådvægt) for regnbueørred. Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. Optagelsesfasen kan efter behov forlænges på baggrund af praktiske erfaringer fra tidligere undersøgelser eller viden om teststoffets (eller dertil svarendes) optagelse og udskillelse i fisk. Testens begyndelse defineres som den første fodring med spiked foder. En testdag starter på det tidspunkt, hvor fiskene fodres, og slutter kort før næste fodring (f.eks. en time). Den første testdag i optagelsesfasen starter ved den første fodring med spiked foder og slutter kort før den anden fodring med spiked foder. I praksis slutter optagelsesfasen kort før (f.eks. en time) første fodring med rent foder, da fiskene vil fortsætte med at fordøje foderet med teststof og absorbere teststoffet i de mellemliggende 24 timer. Det er vigtigt at sikre, at der opnås en tilstrækkelig høj (ikke-giftig) belastning af kroppen fra teststoffet med hensyn til den analytiske metode, således at der kan måles en nedgang i størrelsesorden i udskillelsesfasen. I særlige tilfælde kan der bruges forlængede optagelsesfaser (op til 28 dage) med yderligere prøveudtagning for at opnå viden om optagelseskinetik. Koncentrationen i fiskene når ikke nødvendigvis ligevægt i optagelsesfasen. Ligninger til at beregne tiden indtil ligevægt som en indikation af det tidsrum, der er nødvendigt for at nå op på tydelige koncentrationer i fisk, kan anvendes her som ved testen med eksponering i vand (jf. tillæg 5).

I nogle tilfælde er 7-14 dage til optagelse af stof i fisk ikke tilstrækkelig lang tid til, at den anvendte foderkoncentration når op på en koncentration, der er tilstrækkeligt høj til, at det er muligt at analysere mindst en nedgang i størrelsesorden i udskillelsesfasen, enten på grund af dårlig analytisk følsomhed eller lav assimileringseffektivitet. I sådanne tilfælde kan det være en fordel at forlænge den oprindelige fodringsfase til over 14 dage, eller man bør for især meget omsættelige stoffer overveje en højere koncentration. Det bør dog sikres, at den samlede belastning i optagelsesfasen holdes under den (skønnede) kroniske NOEC-værdi i fiskevæv (punkt 138).

Udskillelsesfasens længde

Udskillelsen varer typisk i op til 28 dage fra det tidspunkt, hvor den første testgruppe fodres med rent, ubehandlet foder efter optagelsesfasen. Udskillelsen starter ved den første fodring med ikke-spiked foder og ikke lige efter den seneste fodring med spiked foder, da fisken vil fortsætte med at fordøje foderet og absorbere teststoffet i de mellemliggende 24 timer som anført i punkt 126. Derfor tages den første prøve i udskillelsesfasen kort tid før den anden fodring med foder uden teststof. I denne udskillelsesperiode opfanges stoffer med en potentiel halveringstid på op til 14 dage, hvilket er i overensstemmelse med halveringstiden for bioakkumulerende stoffer ([1]) — 28 dage

([1]) I en undersøgelse af eksponering i vand vil en halveringstid på 14 dage svare til en BCF på ca. 10 000 L/kg, hvor der anvendes fisk på 1 g med en tilsvarende optagelse på ca. 500 L/kg/dag (ifølge formel udarbejdet af Sijm *et al.* (46)).

▼M7

omfatter altså to halveringstider for disse stoffer. I tilfælde af meget stærkt bioakkumulerende stoffer kan det være en fordel at forlænge udskillelsesfasen (hvis dette er indikeret fra forprøven).

Selv om et stof udskilles meget langsomt, således at det ikke er muligt at bestemme en nøjagtig halveringstid i udskillelsesfasen, kan oplysningerne dog stadig være tilstrækkelige til at indikere et bioakkumuleringsniveau. Hvis et stof omvendt udskilles så hurtigt, at der ikke kan udledes en pålidelig nulstillingskoncentration (koncentration ved slutningen af optagelsen/starten af udskillelsen, $C0_d$), og k_2 ikke kan beregnes, kan der foretages et konservativt skøn over k_2 (jf. tillæg 7).

Hvis analyserne af fisk ved tidligere intervaller (f.eks. 7 eller 14 dage) viser, at stoffet er udskilt under kvantificeringsniveauer inden de fulde 28 dage, vil efterfølgende prøveudtagninger blive indstillet og testen afsluttet.

I nogle få tilfælde er der måske ingen målbar optagelse af teststoffet ved optagelsesperiodens slutning (eller med den anden udskillelsesprøve). Hvis det kan påvises, at: i) validitetskriterierne i punkt 113 er opfyldt, og ii) den manglende anvendelse ikke skyldes andre mangler ved testen (f.eks. at optagelsesfasen ikke har været lang nok, mangler ved spiking-teknikken, som fører til lav biotilgængelighed, ikke tilstrækkeligt følsom analysemetode, at fiskene ikke indtager foder osv.), kan undersøgelsen afsluttes, uden at det er nødvendigt at gennemføre den på ny med en længere optagelsesfase. Hvis forundersøgelsen har vist, at dette kan være tilfældet, anbefales det om muligt at analysere fækalt materiale for ufordøjet teststof som led i en massebalancetilgang.

Antal testfisk

Lige som ved testen med eksponering for teststof i vand bør der vælges fisk af samme vægt og længde, og de mindste fisk må ikke veje mindre end to tredjedele af de største fisks vægt (jf. punkt 40-42).

Det samlede antal fisk i undersøgelsen bør fastlægges på grundlag af prøveudtagningsplanen (mindst en prøve ved afslutningen af optagelsesfasen og fire til seks prøver under udskillelsesfasen, men afhængigt af fasernes varighed), idet der tages hensyn til analyseteknikkens følsomhed, den koncentration, der sandsynligvis vil blive opnået ved optagelsesfasens afslutning (baseret på allerede eksisterende viden) og udskillelsesperiodens varighed (hvis allerede eksisterende viden muliggør skøn). Fem-ti fisk bør udtages hver gang, og vækstparametrene (vægt og længde i alt) måles, før der foretages en analyse af kemikalie eller fedtstof.

På grund af den iboende variation i fiskenes størrelse, vækst og fysiologi og de sandsynlige udsving i den mængde foder, som hver fisk indtager, bør mindst fem fisk udtages ved hvert interval fra testgruppen og fem fra kontrolgruppen for at kunne beregne den gennemsnitlige koncentration og dens variation tilstrækkelig sikkert. Variationen blandt de anvendte fisk kan forventes at bidrage mere til den samlede utilsigtede variation i testen end variationen i de anvendte analytiske metoder, hvilket i nogle tilfælde dermed retfærdiggør brugen af op til ti fisk pr. prøveudtagningspunkt. Hvis det ikke er muligt at måle baggrundskoncentrationer for teststoffet i kontrolfisk ved begyndelsen af udskillelsesfasen, kan det være tilstrækkeligt at foretage en kemisk analyse af to-tre kontrolfisk ved det sidste prøveudtagningsinterval, så længe de resterende kontrolfisk ved alle prøveudtagningspunkter stadig udtages med henblik på måling af vægt og samlet længde (således at der udtages det samme antal prøver fra test- og kontrolgruppen med henblik på måling af vækst). Fisk bør opbevares, vejes enkeltvis (også selv om det viser sig at være nødvendigt efterfølgende at kombinere prøveresultaterne), og den samlede længde måles.

▼M7

Til en standardtest med en udskillelsesfase på f.eks. 28 dage inklusive to udskillelsesprøver betyder dette i alt 59-120 fisk fra testgruppen og 50-110 fisk fra kontrolgruppen, idet det forudsættes, at den analyseteknik, der anvendes til stoffet, gør det muligt at foretage en analyse af fedtindholdet i samme fisk. Hvis der ikke kan foretages en analyse af fedtindhold og indhold af teststof i samme fisk, og det heller ikke er muligt udelukkende at bruge kontrolfisk til at analysere fedtindhold (jf. punkt 56), skal der anvendes yderligere 15 fisk (tre fra stampopulationen ved testens start, tre hver fra kontrol- og testgruppen ved begyndelsen af udskillelsesfasen og tre fra kontrol- og testgruppen ved forsøgets slutning). Et eksempel på en prøveudtagningsplan med antal fisk kan findes i tillæg 4.

Belastning

Der bør anvendes samme vand-fisk-forhold som i metoden med eksponering for teststof i vand (jf. punkt 43 og 44). Selv om fisk-til-vand-belastningsgraden ikke påvirker eksponeringskoncentrationen i denne test, anbefales en belastning på 0,1-1,0 g fisk (vådvægt) pr. liter vand pr. dag for at opretholde passende koncentrationer af opløst ilt og mindske stressbelastningen for testorganismerne.

Testføde og fodring

Under akklimatiseringsperioden bør fiskene fodres med passende foder som beskrevet ovenfor (punkt 117). Hvis testen gennemføres med et gennemstrømningssystem, skal dette standses, mens fiskene fodres.

Under testen skal testgruppen have det ovenfor beskrevne foder (punkt 116-121). Ud over at overveje stofspecifikke faktorer, analytisk følsomhed, forventet koncentration i foderet under miljøforhold og kroniske toksicitetsniveauer/belastning af kroppen, bør der ved valg af spiking-koncentration tages hensyn til foderets smagskvalitet (så fiskene ikke lader være med at spise). Den nominelle spiking-koncentration bør dokumenteres i rapporten. Erfaringen viser, at spiking-koncentrationer i størrelsesordenen 1-1 000 1-1 000 1-1 000 µg/g er et praktisk interval for teststoffer, der ikke udviser en specifik toksisk mekanisme. For stoffer, der fungerer i en ikke-specifik mekanisme, bør restmængden i væv ikke overstige 5 µmol/g fedt, da der er sandsynlighed for, at restkoncentrationer over dette niveau skaber kroniske virkninger (19) (48) (50) [1]. For andre stoffer bør det sikres, at der ikke indtræffer skadelige virkninger på grund af den akkumulerede eksponering (jf. punkt 127). Dette gælder navnlig, hvis der testes mere end et stof samtidig (jf. punkt 112).

Fiskefoderet kan spikes med en passende mængde teststof på en af tre måder, jf. beskrivelsen i punkt 119 og tillæg 7. Spiking-metoderne og -procedurerne bør dokumenteres i rapporten. Kontrolfiskene får uforarbejdet foder med en tilsvarende mængde ikke-spiked oliebærestof, hvis et sådant er brugt i det spikede foder i optagelsesfasen, eller de får foder, der er behandlet med »rent« opløsningsmiddel, hvis der er anvendt opløsningsmiddel/bærestof i testgruppens foder. Det behandlede og ubehandlede foder bør som minimum måles analytisk tre gange for at bestemme teststofkoncentrationen før optagelsesfasens begyndelse og afslutning. Efter eksponering for det behandlede foder (optagelsesfase) fodres fiskene (begge grupper) med ubehandlet foder (udskillelsesfase).

Fiskene får en fast ration (afhængigt af art, f.eks. ca. 1-2 % af fiskenes vådvægt pr. dag for regnbueørred). Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at

[1] Da de faktiske indre koncentrationer først kan fastslås efter testen, er der behov for et skøn over den forventede indre koncentration (f.eks. baseret på den forventede BMF og koncentrationen i foderet, jf. ligning A5.8 i tillæg 5).

▼M7

hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. Den fodermængde, der er fastsat for hele forsøget, bør registreres. Det foder, der gives i starten, bør baseres på vægtmålinger af stampopulationen umiddelbart forud for testens start. Fodermængden bør tilpasses på grundlag af de udtagne fisks vådvægt ved hver prøveudtagning, således at der kan tages hensyn til vækst under forsøget. Test- og kontrolfiskenes vægt og længde kan anslås ud fra vægt og samlet længde af de fisk, der bruges ved hver prøveudtagning. De fisk, der er tilbage i test- og kontroltankene, skal ikke måles og vejes. Det er vigtigt at bevare samme fodermængde gennem hele forsøget.

Fodringen bør observeres for at sikre, at fiskene rent faktisk indtager alt foderet, således at det er de rigtige tal for indtagelse, der bruges i beregningerne. Indledende fodringsforsøg eller tidligere erfaringer bør indgå i overvejelserne ved valg af fodermængde, således at det sikres, at alt foder fra den daglige fodring indtages. Hvis foderet konsekvent ikke spises op, kan det anbefales at sprede fodringen (f.eks. fordele samme fodermængde over to fodringer dagligt i stedet for en). Hvis dette er nødvendigt, bør den anden fodring ske på samme tid hver dag, og således at der går mest mulig tid før den første udtagning af fiskeprøver (f.eks. så den anden fodring også finder sted i løbet af første halvdel af en forsøgsdag).

Skønt fisk normalt er hurtige til at indtage foderet, er det vigtigt at sikre, at stoffet forbliver adsorberet til foderet. Det bør undgås, at teststoffet spredes i vandet fra foderet, da fiskene i så fald eksponeres for koncentrationer af teststoffet i vandet ud over eksponeringen i foderet. Dette kan opnås ved at fjerne foderrester (og faeces) fra test- og kontroltankene senest en time, men helst kun en halv time efter fodring. Desuden kan man anvende et system, hvor vandet løbende renses gennem et filter med aktivt kul for at absorbere eventuelle »opløste« forurenende stoffer. Gennemstrømningssystemer kan hurtigt fjerne foderpartikler og opløste stoffer ([1]). En mindre ændring af teknikken for spiking af foderet kan bidrage til at mindske dette problem (jf. punkt 119).

Lys og temperatur

Som med eksponering i vand (jf. punkt 48) anbefales en lysperiode på 12-16 timer og en temperatur på ± 2 °C til den fiskeart, der bruges i testen (jf. tillæg 3). Belysningens type og karakteristika bør være kendt.

Kontroller

Der bør bruges en kontrolgruppe, hvor fiskene fodres med samme ration som testgruppen, men uden teststof i foderet. Hvis der som bærestof bruges olie eller opløsningsmiddel til at spike foderet i testgruppen, bør kontrolgruppens foder behandles på nøjagtig samme måde, men ikke tilsættes teststof, således at test- og kontrolgruppen ellers får samme foder (jf. punkt 121 og 139).

([1]) Det er måske ikke muligt fuldstændig at undgå tilstedeværelsen af teststof i testmediet som følge af fiskenes udskillelse eller udvaskning fra foderet. En mulighed er derfor at måle stofkoncentrationen i vand ved afslutningen af udskillelsesfasen, især hvis der anvendes en semistatisk metode, for at afdække eventuel eksponering i vand.

▼M7

Hyppighed af målinger af vandkvaliteten

De betingelser, der er beskrevet for metoden med eksponering i vand, gælder også her, bortset fra at TOC kun skal måles før prøven som en del af beskrivelsen af testvandet (jf. punkt 53).

Prøveudtagning og analyse af fisk og føde

Analyse af foderprøver

Prøver af test- og kontrolfoderet bør analyseres mindst tre gange for teststof og fedtindhold og mindst før begyndelsen og afslutningen af optagelsesfasen. Analysemetoderne og procedurerne til sikring af fødens homogenitet bør beskrives i rapporten.

Prøverne bør analyseres for teststof ved hjælp af en kendt, valideret metode. Der bør gennemføres forundersøgelser for at bestemme kvantificeringsgrænsen, den procentvise genfinding, interferens og analytisk varians i den ønskede prøvematrix. Hvis der testes radioaktivt mærket stof, anbefales det at gøre de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand, idet analysen af vand her erstattes af en analyse af foder (jf. punkt 65).

Analyse af fisk

Ved hver udtagning af fiskeprøver udtages 5-10 fisk fra eksponerings- og kontrolbehandlinger (i nogle tilfælde kan antallet af kontrolfisk reduceres, jf. punkt 134).

Prøver bør udtages på samme tid hver forsøgsdag (i forhold til fodringstid) og bør ske på et tidspunkt, hvor sandsynligheden for, at der stadig er foder i tarmen under optagelsesfasen og begyndelsen af udskillelsesfasen, mindskes for at forebygge fordrejende bidrag til de samlede stofkoncentrationer (dvs. at udtagne fisk bør fjernes ved forsøgsdagens slutning, idet der gøres opmærksom på, at en forsøgsdag starter på fodringstidspunktet og slutter ved næste fodring, dvs. ca. 24 timer senere. Udskillelsesfasen begynder, første gang der fodres med ikke-spiked foder, jf. punkt 128). Den første prøve fra udskillelsesfasen (der udtages kort før anden fodring med ikke-spiked foder) er vigtig, da ekstrapolering tilbage en dag fra denne måling bruges til at anslå nulstillingskoncentrationen ($C_{0,d}$, koncentrationen i fiskene ved optagelsesfasens afslutning/udskillelsesfasens begyndelse). Alternativt kan fiskens mave-tarm-system fjernes og analyseres separat ved slutningen af optagelsesfasen og på dag 1 og 3 i udskillelsesfasen.

Ved hver prøveudtagning bør fiskene fjernes fra de to testbeholdere og behandles som beskrevet under metoden med eksponering i vand (jf. punkt 61-63).

Koncentrationer af teststof i hele fisk (vådvægt) måles mindst ved udgangen af optagelsesfasen og under udskillelsesfasen i både kontrol- og testgruppe. Under udskillelsesfasen anbefales 4-6 prøveudtagningspunkter (f.eks. efter 1, 3, 7, 14 og 28 dage). Alternativt kan der medtages yderligere et prøveudtagningspunkt efter 1-3 dages optagelse for at anslå assimileringseffektiviteten fra den lineære optagelsesfase for fisken, men stadig tæt ved eksponeringsfasens begyndelse. Der findes to primære afvigelser fra planen: i) hvis optagelsesfasen forlænges med det formål at undersøge optagelseskinetik, kommer optagelsesfasen til at omfatte yderligere prøveudtagningspunkter, hvorfor der er behov for flere fisk (jf. punkt 126), ii) hvis undersøgelsen afsluttes ved udgangen af optagelsesfasen, fordi det ikke har været muligt at måle optagelsen (jf. punkt 131). De enkelte

▼M7

udtagne fisk bør vejes (og deres længde i alt måles) med henblik på at bestemme væksthastighedskonstanter. Koncentrationer af teststof i bestemt fiskevæv (spiselige og ikke-spiselige dele) kan også måles ved optagelsesfasens slutning og på udvalgte tidspunkter under udskillelsesfasen. Hvis der testes radioaktivt mærket stof, anbefales det at gøre de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand, idet analysen af vand her erstattes af en analyse af foder (jf. punkt 65).

Med hensyn til periodisk anvendelse af referencestof (jf. punkt 25) anbefales det, at koncentrationerne måles i testgruppen ved optagelsesfasens slutning og på alle de tidspunkter under udskillelsesfasen, der er specificeret for teststoffet (hele fisk). Koncentrationerne behøver kun at blive analyseret i kontrolgruppen ved optagelsesfasens slutning (hele fisk). Under visse omstændigheder (f.eks. hvis analyseteknikkerne for teststof og referencestof er uforenelige, således at der er behov for flere fisk for at følge prøveudtagningsplanen) kan en anden tilgang vælges for at mindske behovet for yderligere fisk. Koncentrationer af referencestoffet måles kun på dag 1 og 3 og på to andre prøveudtagningstidspunkter under udskillelsesfasen, som skal ligge på tidspunkter, der gør det muligt at foretage pålidelige skøn over nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) og k_2 for referencestoffet.

Hvis det er muligt, bør den enkelte fisks fedtindhold bestemmes ved hver prøveudtagning eller som minimum ved optagelsesfasens start og afslutning og udskillelsesfasens afslutning (jf. punkt 56 og 67). Afhængigt af analysemetode (jf. punkt 67 og tillæg 4) kan det være muligt at anvende samme fisk til bestemmelse af både fedtindhold og teststofkoncentration. Dette anbefales af hensyn til ønsket om at reducere antallet af anvendte fisk. Hvis dette ikke er muligt, kan samme tilgang som beskrevet under metoden med eksponering i vand bruges (jf. punkt 56 for disse alternative muligheder for måling af fedtindhold). Den metode, der anvendes til at kvantificere fedtindholdet, bør dokumenteres i rapporten.

Analysemetodens egnethed

Der bør foretages kontroller af forsøget for at sikre den stofspecifikke analyseteknik specificitet og reproducerbarhed samt genfindinger af teststof fra både foder og fisk.

Måling af fiskenes vækst

Ved teststarten skal udtagne fisk fra stampopulationen vejes (og deres samlede længde måles). Disse fisk bør udtages kort før første fodring med spiked foder (f.eks. en time) og hensættes til forsøgsdag 0. Der bør i denne prøveudtagning udtages samme antal fisk som ved udtagninger under testen. Nogle af disse fisk kan anvendes til at analysere fedtindhold før optagelsesfasens start (jf. punkt 153). Ved hver prøveudtagning vejes fiskene, og deres længde måles. For hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde sættes i forhold til den analyserede kemiske koncentration (og fedtindhold, hvis det er relevant), f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagen fisk. Målingerne af de udtagne fisk kan anvendes til at anslå vægten (og længden) af fisk, der bliver tilbage i test- og kontroltanke.

Evaluering af forsøget

Dødelighed bør observeres og registreres dagligt. Yderligere observationer for skadelige virkninger bør foretages, f.eks. for unormal adfærd eller pigmentering, og disse bør registreres. Fisk anses for at være døde, hvis der ikke er åndedrætsbevægelser, og der ikke er reaktion på let mekanisk stimulus. Døde eller tydeligt moribunde fisk bør fjernes.

▼M7

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Testresultater bruges til at udlede udskillelseshastighedskonstanten (k_2) som en funktion af fiskenes samlede vådvægt. Vækshastighedskonstanten, k_g, baseret på fiskenes gennemsnitlige vægtforøgelse, beregnes og anvendes til at udlede den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant k_{2g}, hvis dette er relevant. Assimileringseffektiviteten (a, absorption fra tarmen), den kinetiske biomagnetificeringsfaktor (BMF_K) (om nødvendigt vækstkorrigeret, BMF_{Kg}), den lipidkorrigerede værdi (BMF_{KL} eller BMF_{KgL}, hvis der er korrigeret for vækstfortynding) og fodringsmængde bør rapporteres. Hvis der kan foretages et skøn over den tid, det tager at opnå ligevægt i optagelsesfasen (f.eks. 95 % af ligevægt eller t_{95} = 3,0 /k_2), kan der medtages et skøn over ligevægts-BMF (BMF_{SS}) (jf. punkt 105 og 106 og tillæg 5), hvis værdien T_{95} angiver, at betingelserne for ligevægt kan være opfyldt. Der bør anvendes samme korrigering for fedtindhold på denne BMF_{SS} som på den kinetisk beregnede BMF (BMF_K) for at få en lipidkorrigeret værdi, BMF_{SSL} (det bemærkes, at der ikke findes en vedtagen procedure til at korrigere et ligevægts-BMF for vækstfortynding). Formler og eksempler på beregninger findes i tillæg 7. Der findes metoder, som gør det muligt at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_K) fra data fra foderundersøgelsen. Dette diskuteres i tillæg 8.

Data om fisks vægt/længde

De enkelte fisks vægt og længde for alle tidsperioder indføres i tabeller for hver test- og kontrolgruppe for alle prøveudtagningsdage i optagelsesfasen (stampopulation for begyndelsen af optagelsesfasen, kontrolgruppe og testgruppe for slutningen af optagelsesfasen og den tidlige fase, hvis en sådan findes (f.eks. dag 1-3 i optagelsesfasen) og udskillelsesfasen (f.eks. dag 1, 2, 4, 7, 14 og 28 for kontrol- og testgruppe)). Vægt er den foretrukne måde at måle vækst på af hensyn til korrigering for vækstfortynding. Se nedenfor (punkt 162 og 163) og tillæg 5 for de metoder, der anvendes til at korrigere data for vækstfortynding.

Data vedrørende teststofkoncentration i fisk

Målinger af rester af teststof i de enkelte fisk (eller poolede fiskeprøver, hvis det ikke er muligt at foretage målingerne i de enkelte fisk), udtrykt i vådvægtskoncentration (vægt/vægt) indføres i tabeller for test- og kontrolfisk for de enkelte prøveudtagningstidspunkter. Hvis fedtindholdet er analyseret for hver udtagen fisk, kan de individuelle fedtkorrigerede koncentrationer udtrykt i lipidkoncentration (vægt/vægt lipid) beregnes og opstilles i tabelform.

— Målinger af rester af teststof i de enkelte fisk (eller poolede fiskeprøver, hvis det ikke er muligt at foretage målingerne i de enkelte fisk, jf. punkt 66) for udskillelsesperioden konverteres til deres naturlige logaritmer og plottes i forhold til tid (dag). Hvis en visuel undersøgelse af kurven viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades.

— En lineær mindste kvadraters korrelation beregnes for data for ln (koncentration) i forhold til udskillelse (dag). Linjernes skæringspunkt og hældning rapporteres som den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2) og den naturlige logaritme af den afledte nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) (se tillæg 5 og 7 for yderligere oplysninger). Hvis dette ikke er muligt, fordi koncentrationerne falder til under kvantificeringsgrænsen for den anden udskillelsesprøve, kan der anlægges et konservativt skøn for k_2 (jf. tillæg 7).

— Varianserne i kurvens hældning og skæringspunkt beregnes under anvendelse af statistiske procedurer, og konfidensintervaller på 90 % (eller 95 %) omkring disse resultater evalueres og fremlægges.

▼M7

— Den gennemsnitlige målte koncentration i fisk for den sidste optagelsesdag (målt nulstillingskoncentration, $C0_m$) beregnes også og sammenholdes med den afledte værdi $C0_{0,d}$. Hvis den afledte værdi er lavere end den målte værdi, kan forskellen indikere tilstedeværelse af ufordøjet, spiked foder i tarmen. Hvis den afledte værdi er meget højere end den målte værdi, kan dette være en indikation af, at den værdi, der er afledt af data fra den lineære regression for udskillelsen, er forkert og bør revurderes (jf. tillæg 7).

Udskillelseshastighedskonstant og biomagnificeringsfaktor

For at beregne biomagnetificeringsfaktoren fra dataene bør assimileringseffektiviteten (absorption af teststof i tarmene, α) først beregnes. Hertil bør man benytte ligning A7.1 i tillæg 7, hvor den udledte koncentration i fisk ved udskillelsesfasens nulstilling (C_{0d}), (samlet) udskillelseshastighedskonstant (k_2), koncentration i foder (C_{food}), hastighedskonstant for fødeoptagelse (I) og varighed af optagelsesperioden (t) skal være kendte. Hældning og skæringspunkt i den lineære forbindelse mellem ln(koncentration) og udskillelsestid rapporteres som den overordnede hastighedskonstant for udskillelse (k_2 = hældning) og nulstillingskoncentration ($C_{0,d} = e^{intercept}$), som ovenfor. De afledte værdier bør kontrolleres for biologisk sandsynlighed (f.eks. assimileringseffektivitet som en fraktion, der ikke er større end 1). *(I)* beregnes ved at dividere massen af foder med massen af fisk, der fodres hver dag (hvis de fodres med 2 % af kropsvægten, vil (*I)* være 0,02). Men det kan blive nødvendigt at tilpasse den fodermængde, der er anvendt ved beregningen, til fiskenes vækst (dette kan gøres ved at benytte den kendte vækshastighedskonstant til at anslå fiskenes vægt på hvert tidspunkt under optagelsesfasen, jf. tillæg 7). I tilfælde, hvor k_2 og $C_{0,d}$ ikke kan beregnes, f.eks. fordi koncentrationer faldt til under detektionsgrænsen for den anden udskillelsesprøve, kan der anlægges et konservativt skøn over k_2 og en »øvre« BMF_k (jf. tillæg 7).

Når assimileringseffektiviteten (α) er opnået, kan bioakkumuleringsfaktoren beregnes ved at gange α med indtagelseshastighedskonstanten (I) og dividere med den (samlede) udskillelseshastighedskonstant (k_2). Den vækstkorrigerede biomagnificeringsfaktor beregnes derefter på samme måde, men her ved at anvende den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant, jf. punkt 162 og 163. Et alternativt skøn over assimileringseffektiviteten kan anlægges, hvis der er foretaget en vævsanalyse på fisk, der er udtaget i den tidlige, lineære fase af optagelsesfasen, jf. punkt 151 og tillæg 7. Denne værdi repræsenterer et uafhængigt skøn over assimileringseffektiviteten for en i det væsentlige ikke eksponeret organisme (dvs. at fiskene er tæt ved optagelsesfasens begyndelse). Assimileringseffektiviteten som anslået ud fra udskillelsesdataene benyttes sædvanligvis til at udlede BMF.

Korrigering for fedtindhold og vækstfortynding

Fiskenes vækst i udskillelsesfasen kan sænke målte kemikaliekoncentrationer i fiskene, hvilket betyder, at den samlede udskillelseskonstant, k_2, er større, end den ville have været ved rene fjernelsesprocesser (f.eks. stofskifte eller egestion) (jf. punkt 72). Fedtindhold i testfisk (som hænger tæt sammen med bioakkumuleringen af hydrofobe stoffer) og fedtindholdet i foder kan variere nok i praksis til, at det er nødvendigt at korrigere herfor, hvis biomagnificeringsfaktorer skal kunne fremlægges på en fornuftig måde. Biomagnificeringsfaktoren bør korrigeres for vækstfortynding (som den kinetiske BCF i metoden med eksponering i vand) og for fedtindholdet i foderet i forhold til i fiskene (lipidkorrektionsfaktoren). Ligninger og eksempler på disse beregninger kan ses i henholdsvis tillæg 5 og 7.

For at korrigere for vækstfortynding bør den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) beregnes (se tillæg 5 for ligninger). Denne vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) bruges derefter til at beregne den vækstkorrigerede biomagnificeringsfaktor, jf. punkt 74. I nogle tilfælde er denne metode

▼M7

ikke mulig. I en alternativ tilgang, der omgår behovet for korrigering for vækstfortynding, anvendes udskillelsesdata for teststofmasse pr. fisk (hel) i stedet for de normale (koncentrations)data for teststofmængde pr. enhed fiskemasse. Dette kan nemt opnås, da test i henhold til denne metode bør forbinde registrerede vævskoncentrationer med den enkelte fisks vægt. En enkel procedure hertil er beskrevet i tillæg 5. Bemærk, at k_2 stadig bør skønnes og rapporteres, også hvis det er den alternative metode, der anvendes.

For at korrigere for fedtindholdet i foderet og fiskene, når der ikke er foretaget en analyse for fedtindhold af alle udtagne fisk, udledes middelfedtfraktioner (vægt/vægt) i fiskene og foderet ([1]). Lipidkorrektionsfaktoren (L_c) beregnes derefter ved at dividere den gennemsnitlige lipidfraktion i fisk med den gennemsnitlige lipidfraktion i foderet. Biomagnetificeringsfaktoren (vækstkorrigeret, hvor det er relevant) divideres med lipidkorrektionsfaktoren for at beregne den lipidkorrigerede biomagnetificeringsfaktor.

Hvis samme fisk analyseres for kemikalie og fedtindhold ved hvert udtagningspunkt, kan de lipidkorrigerede data for den enkelte fisks væv bruges til en direkte beregning af en lipidkorrigeret BMF (jf. (37)). Plottet over lipidkorrigerede koncentrationsdata giver $C_{0,d}$ på grundlag af fedtindhold og k_2. Der kan derefter foretages en matematisk analyse, hvor der anvendes de samme ligninger i tillæg 7, men assimileringseffektiviteten (a) beregnes ved hjælp af den lipidnormaliserede hastighedskonstant for fødeoptagelse (I_{lipid}) og foderkoncentrationen på grundlag af fedtindhold ($C_{food\text{-}lipid}$). På samme måde bruges lipidkorrigerede parametre til at beregne BMF (bemærk, at korrigeringen for vækshastighedskonstanten også bør anvendes på lipidfraktionen i stedet for fiskens vådvægt til at beregne den lipidkorrigerede, vækstkorrigerede BMFKgL).

Fortolkning af resultater

Gennemsnitlig vækst i både test- og kontrolgrupper bør i princippet, for at udelukke toksiske virkninger, ikke adskille sig væsentligt fra hinanden. Vækshastighedskonstanterne eller vækstkurverne for de to grupper sammenlignes med en passende procedure ([2]).

Testrapport

Efter undersøgelsen udarbejdes der en endelig rapport, som skal indeholde oplysninger om *teststof*, *dyreart* og *testbetingelser* som anført i punkt 81 (som med metoden med eksponering i vand). Der kræves endvidere følgende oplysninger:

Teststof:

— oplysninger om prøvestoffets stabilitet i fremstillet foder.

([1]) Denne tilgang er specifik for undersøgelsen af eksponering i foder, som adskiller sig fra den procedure, der følges i undersøgelsen af eksponering i vand, hvorfor ordene »korrigering« og »korrektion« er anvendt i stedet for »normalisering« for at undgå forvirring — jf. også fodnoten til punkt 106.

([2]) Der kan foretages en *t*-test på vækshastighedskonstanterne for at undersøge, om der er forskelle i væksten mellem kontrol- og testgrupper, eller en *F*-test i tilfælde af variansanalyse. Der kan om nødvendigt gennemføres en *F*-test eller sandsynlighedskvotienttest som hjælp til at vælge en passende vækstmodel (OECD's monografi 54, (32)).

▼M7

Testbetingelser:

— den nominelle koncentration af stof i foder, spiking-teknik, mængde (lipid) bærestof, der anvendes i spikingen af foderet (hvis et sådant anvendes), målinger af teststofkoncentration i spiked foder til hver analyse (mindst tre målinger inden undersøgelsens begyndelse og optagelsesfasens slutning) og middelværdier

— type og kvalitet af eventuelt bærestofolie eller opløsningsmiddel (kvalitet, leverandør osv.) anvendt til at spike foder

— anvendt fodertype (omtrentlig analyse ([1]), kvalitet, leverandør osv.), fodringsintervaller optagelsesfasen, administreret fodermængde og frekvens (inklusive eventuelle tilpasninger baseret på udtagne fisks vægt)

— tidspunkt, hvor fiskene indsamles og aflives med henblik på kemisk analyse for hvert prøveudtagningspunkt (f.eks. en time før den følgende dags fodring).

Resultater:

— resultater fra eventuelle forundersøgelser

— oplysninger om eventuelle negative virkninger

— fuldstændig beskrivelse af alle kemiske analyseprocedurer, herunder detektions- og kvantificeringsgrænser samt variation og genfinding

— målte fedtkoncentrationer i foder (spiked foder og kontrolfoder), individuelle værdier, gennemsnitsværdier og standardafvigelser

— i tabelform: data for den enkelte fisks vægt (og længde), både for kontrol- og eksponeringsgrupper (f.eks. ved at anvende unikke identifikatorer for hver fisk) og beregninger, afledte væksthastighedskonstant(er) og 95 %-konfidensintervaller

— i tabelform: data for teststoffets koncentration i fisk, gennemsnitlig målt koncentration ved optagelsesfasens slutning ($C_{0,m}$), og afledt (samlet) udskillelseshastighedskonstant (k_2) og koncentration i fisk ved udskillelsesfasens start ($C_{0,d}$) sammen med varianser i disse værdier (hældning og skæringspunkt)

— i tabelform: data for fedtindhold i fisk (sammenholdt med specifikke stofkoncentrationer, hvis disse foreligger), middelværdier for test- og kontrolgruppe ved testens start samt optagelses- og udskillelsesfasens slutning

— kurver (og alle målte data), der viser følgende (eventuelle koncentrationer kan udtrykkes både i forhold til hele dyrets krop eller specificeret væv deraf):

  — vækst (dvs. fiskens vægt (og længde) i forhold til tid) eller vægt i forhold til tid transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme

([1]) En teknik til analyse af protein, fedtstof, grove fibre og aske i foderet; denne oplysning kan normalt fås fra leverandøren

▼M7

— udskillelse af teststoffet i fiskene

— koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme (ln koncentration) i forhold til udskillelsestid (herunder den afledte udskillelseshastighedskonstant k_2 og koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i fisk ved udskillelsesfasens start, $C_{0,d}$)

— hvis en visuel undersøgelse af en kurve viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades

— beregnet vækstkorrigeret udskillelseskonstant og vækstkorrigeret halveringstid

— stoffets assimileringseffektivitet (α)

— »rå« BMF for foderet, kinetisk BMF korrigeret for fedt og vækstfortynding (»rå« og lipid-korrigeret på grundlag af hele fisks vådvægt), evt. vævsspecifik BMF

— oplysninger om radioaktivt mærket prøvestof, metabolitter og akkumulering deraf

— alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger

— en sammenfattende oversigt over relevante målte og beregnede data som følger:

Udskillelseshastighedskonstanter og biomagnificeringsfaktorer (BMF_K) for stof	
k_g (vækstthastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
k_2 (samlet udskillelseshastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI)
k_{2g} (vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant, dag^{-1}):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (målt nulstillingskoncentration, koncentrationen i fisk ved optagelsesfasens slutning) (µg/g):	Indsæt værdi ± SD (2)
$C_{0,d}$ (afledt nulstillingskoncentration efter udskillelsesfasen; µg/g):	Indsæt værdi ± SD (2)
I (fastsat foderindtag; g foder/g fisk/dag):	Indsæt værdi
I_g (effektiv fodring, korrigeret for vækst; g foder/g fisk/dag) (2):	Indsæt værdi ± SD (2)
C_{food} (koncentration af kemikalie i foder, µg/g).	Indsæt værdi ± SD (2)
α (stoffets assimileringseffektivitet):	Indsæt værdi ± SD (2)
BMF_K (kinetic BMF i foder):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (vækstkorrigeret kinetisk BMF i foder):	Indsæt værdi (95 % CI) (1)

▼M7

Udskillelseshastighedskonstanter og biomagnificeringsfaktorer (BMF_K) for stof	
$T_{1/2G}$ (vækstkorrigeret halveringstid i dage):	Indsæt værdi ± SD ([2])
Lc (korrektionsfaktor for fedtindhold):	Indsæt værdi
BMF_{KgL} (fedtkorrigeret, vækstkorrigeret kinetisk BMF):	Indsæt værdi
$BMF_{SS\text{-}L}$ (vejledende fedtkorrigeret BMF i ligevægt) ([2]):	Indsæt værdi ± SD ([2])

([1]) CI: konfidensinterval (hvor det er muligt at anslå).
([2]) SD: standardafvigelse (hvor det er muligt at anslå).

LITTERATUR

(1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.

(2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.

(5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.*

(6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.*

(7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions.*

(10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure.*

(11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability.*

(12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability — CO_2 in sealed vessels*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.*

(23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*

(24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test.*

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER OG ENHEDER

Assimileringseffektiviteten (α) er et mål for den relative mængde stof absorberet i organismen fra tarmen (α er ikke en enhed, men udtrykkes ofte i procent i stedet for som en fraktion).

Bioakkumulering betegnes normalt som en proces, hvor stoffets koncentration i en organisme når et niveau, der overstiger niveauet i det respiratoriske medium (f.eks. vand for en fisk eller luft for et pattedyr), foderet eller begge dele(1).

Ved biokoncentrering forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificeret væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium.

Ved biokoncentreringsfaktoren (BCF eller K_B) på et givet tidspunkt under optagelsesfasen i denne akkumuleringstest forstås koncentrationen af teststoffet i/på fiskene eller specificeret væv deraf (C_f som mg/kg) divideret med koncentrationen af det kemiske stof i det omgivende medium (C_w som mg/l). BCF udtrykkes i $l \cdot kg^{-1}$. Bemærk, at korrektioner for vækst og/eller standardfedtindhold ikke er medregnet.

Ved biomagnetificering forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificeret væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i foderet.

Ved biomagnificeringsfaktoren (BMF) forstås koncentrationen af et stof i et rovdyr i forhold til koncentrationen i rovdyrets bytte (eller foder) ved ligevægt. I den metode, der er beskrevet i forsøgsmetoden, undgås eksponering i vandfasen omhyggeligt, og en BMF-værdi fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes med en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Fødebiomagnificeringsfaktoren (føde-BMF) anvendes i denne forsøgsmetode til at beskrive resultatet af eksponering i foder, hvor eksponering i vandfasen omhyggeligt undgås, og føde-BMF fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Ved udskillelsesfasen eller fasen efter eksponering forstås det tidsrum efter overførsel af forsøgsfiskene fra et medium indeholdende teststoffet til et medium uden stoffet, hvor man undersøger udskillelsen (eller nettoafgivelsen) af stoffet fra forsøgsfiskene (eller specificeret væv deraf).

Ved hastighedskonstant for udskillelse (k_2) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsfaldet af teststoffet i forsøgsfiskene (eller specificeret væv deraf), efter at de er overført fra et medium indeholdende teststoffet til et medium uden dette stof (k_2 udtrykkes i dag^{-1}).

Opløst organisk kulstof (DOC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra opløste organiske kilder i testmediet.

Ved eksponeringsfasen eller optagelsesfasen forstås det tidsrum, hvori fiskene udsættes for teststoffet.

Foderindtaget (I) er den gennemsnitlige mængde foder, som hver fisk æder pr. dag, i forhold til dens anslåede gennemsnitlige hele kropsvægt (udtrykt som g foder/g fisk pr. dag).

▼**M7**

Ved den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCFK) forstås forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse, k_1, og hastighedskonstanten for udskillelse, k_2 (dvs. k_1/k_2 — se tilsvarende definitioner i dette tillæg). I princippet skal værdien være sammenlignelig med BCF_{SS} (se definition ovenfor), men der kan forekomme afvigelser, hvis det ikke er sikkert, at der er opnået ligevægt, eller hvis der er anvendt korrektioner for vækst på den kinetiske BCF.

Den lipidnormaliserede kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_{KL}) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 %.

Den lipidnormaliserede, vækstkorrigerede kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_{KgL}) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 % og korrigeret for vækst i forsøgsperioden som beskrevet i tillæg 5.

Den lipidnormaliserede ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{SSL}) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 %.

Et stof bestående af flere forskellige bestanddele defineres i REACH som et stof, der har mere end en bestanddel i en koncentration på 10-80 % (vægt/vægt).

Ved octanol-vand-fordelingskoefficienten (K_{OW}) forstås forholdet mellem et stofs opløselighed i *n*-octanol og vand ved ligevægt (metode A.8 (2), A.24 (3) og A.23 (4)), også betegnet P_{OW}. Logaritmen til K_{OW} benyttes som en indikation af et stofs potentiale for biokoncentrering i vandorganismer.

Organiske kulstofpartikler (POC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra suspenderede organiske kilder i testmediet.

En fastfase-mikroekstraktion (SPME) er en analyseteknik uden opløsningsmiddel, der er udviklet med henblik på at fortynde systemer. I denne metode eksponeres en polymerbelagt fiber for den gasfase eller flydende fase, som indeholder den relevante analyt. Generelt kræves en minimumsanalysetid, således at der etableres ligevægtsforhold mellem faste og flydende faser, for så vidt angår de målte arter. Efterfølgende kan koncentrationen af den relevante analyt bestemmes direkte fra fiberen, eller efter at den er ekstraheret fra fiberen i et opløsningsmiddel, afhængigt af bestemmelsesteknikken.

Man taler om ligevægtstilstand i plottet over testkemikaliet i fisk (C_f) mod tid, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikant stigning i C_f i tidsrummet mellem den første og den sidste vellykkede analyse. Ved pooling af prøver til analyse kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende.

Ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}) ændrer sig ikke væsentligt over et længere tidsrum, idet koncentrationen af teststoffet i det angivende medium er konstant i dette tidsrum (jf. Definition af ligevægt).

Totalt indhold af organisk kulstof (TOC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra alle organiske kilder i testmediet, herunder partikler og opløste kilder.

Ved hastighedskonstant for optagelse (k_1) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsforøgelsen af teststoffet i eller på fiskene (eller specificeret væv deraf), når fiskene udsættes for stoffet (k_1 udtrykkes i $l\ kg_{-1}\ dag_{-1}$).

Stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologisk materiale betegnes UVCB

▼**M7**

Et kemikalie er et stof eller en blanding.

Et testkemikalie er et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Kapitel A.8 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (n-octanol/vand): Rystekolbe-metoden*

(3) Kapitel A.24 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (n-octanol/vand), HPLC-metoden*.

(4) Kapitel A.23 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (1-octanol/vand): Slow-stirring-metoden*

▼M7

Tillæg 2

NOGLE KEMISKE EGENSKABER VED ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Komponent	Koncentrationsgrænse
Faste stoffer	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Residualt chlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

▼M7

Tillæg 3

FISKEARTER ANBEFALET TIL TEST

Anbefalet art	Anbefalet testtemperaturinterval (°C)	Anbefalet længde af testfisk (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20-25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tykhovedet elritse	20-25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Skælkarpe	20-25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Japansk risfisk	20-25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20-25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque)	20-25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchuss mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Regnbueørred	13-17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Trepigget hundestejle	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Det skal bemærkes, at i testen er vægt den foretrukne målestok for afvigelser, for så vidt angår størrelse og vækstthastighedskonstant. Det erkendes dog, at længde er en mere praktisk målestok, hvis fiskene skal vælges ud fra udseende ved et forsøgs start (dvs. fra stampopulationen).

(3) Dette længdeinterval er beskrevet i forsøgsmetoder for nye kemiske stoffer osv., baseret på Japans lov om kontrol med kemiske stoffer (CSCL).

En række brakvands- og saltvandsarter er blevet anvendt i mindre omfang, f.eks.

Trommefisk	(*Leiostomus xanthurus*)
Fårehoved-tandkarpe	(*Cyprinodon variegatus*)
Stribefisk	(*Menidia beryllina*)
Brændingsaborre	(*Cymatogaster aggregata*)
»English sole«	(*Parophrys vetulus*)
»Staghorn sculpin«	(*Leptocottus armatus*)
Trepigget hundestejle	(*Gasterosteus aculeatus*)
Havaborre	(*Dicentracus labrax*)
Løje	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

De i ovenstående tabel opregnede ferskvandsfisk er lette at opdrætte og/eller fremskaffe hele året, mens saltvands- og brakvandsarterne til dels kun findes i bestemte lande. De kan opdrættes enten i fiskedamme eller i laboratoriet under kontrollerede forhold med hensyn til sygdomme og parasitter, så testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk kan fås over det meste af verden.

LITTERATUR

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Tillæg 4

PRØVEUDTAGNINGSPLAN FOR TEST MED EKSPONERING I VAND OG FØDE

1. **Teoretisk eksempel på en prøveudtagningsplan for komplet biokoncentreringstest med eksponering for et stof med log K_{OW} = 4.**

Udtagning af fiskeprøver	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal vandprøver (1)	Antal fisk pr. prøve (1)
	Mindste hyppighed (dage) (2)	Supplerende prøveudtagning (dage) (2)		
Optagelsesfase				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	2)	(4)
6	4,7		2	4-8 (5)
				(3 (6))
Udskillelsesfase				Fiskene overføres til vand uden teststof
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4-8 (5)
		17,5		(4+3 (6))
I ALT				40-72 (48-80) (5)

(1) Tallene i parentes angiver, hvor mange prøver (vand, fisk) der skal udtages, hvis der foretages supplerende prøveudtagning.
(2) Forud for testen er k_2 for en log K_{OW} på 4,0 skønnet til $0{,}652^{-1}$ dage. Forsøgets samlede varighed sættes til $3 \times t_{SS} = 3 \times 4{,}6$ dage, dvs. 14 dage. For skøn af t_{SS} henvises der til tillæg 5.
(3) Der udtages en vandprøve efter aftapning af vand svarende til mindst tre gange kammerets rumfang.
(4) Disse fisk udtages fra stampopulationen.
(5) Hvis der er behov for større præcision eller undersøgelser af metabolisme, der kræver flere fisk, bør disse navnlig udtages ved slutningen af optagelses- og udskillelsesfasen (jf. punkt 40).
(6) Der kan være behov for yderligere tre fisk til analyse af fedtindhold, hvis det ikke er muligt at bruge samme fisk som dem, der blev udtaget til måling af stofkoncentrationer ved testens start, optagelsesfasens slutning og udskillelsesfasens afslutning. Det skal bemærkes, at det i mange tilfælde burde være muligt kun at bruge tre kontrolfisk (jf. punkt 56).

▼M7

2. **Teoretisk eksempel på prøveudtagningsplan for bioakkumuleringstest af stof i foder efter 10 dages optagelsesfase og 42 dages udskillelsesfase.**

Prøveudtagning	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal foderprøver	Antal fisk pr. prøve	
	Dag i fase	Prøver af flere fisk?		Testgruppe	Kontrolgruppe
Optagelsesfase					
1	0	Mulig ([1]) ([2])	3 — testgruppe	0	5-10
			3 — kontrolgruppe ([1])		(8-13) ([2])
1A ([3])	1-3			5-10	5-10
2	10	Ja ([4])	3 — testgruppe	10-15 ([4])	5-10
			3 — kontrolgruppe ([1])	(13-18) ([5])	(8-13) ([5])
Udskillelsesfase					
3	1	Ja ([4])		10-15 ([4])	5-10
4	2			5-10	5-10
5	4			5-10	5-10
6	7	Ja ([4])		10-15 ([4])	5-10
7	14			5-10	5-10
8	28			5-10	5-10
9	42	Ja ([4])		10-15 ([4]) (13-18) ([5])	5-10 (8-13) ([5])
I ALT				59-120 (63-126) ([4]) ([5])	50-110 (56-116) ([4]) ([5])

([1]) Tre foderprøver fra både kontrol- og testgruppe analyseret for teststofkoncentrationer og fedtindhold.
([2]) Fisk udtages fra stampopulationen så tæt ved undersøgelsens start som muligt. Mindst tre fisk fra stampopulationen bør udtages til analyse af fedtindhold ved teststart.
([3]) (Ikke-obligatorisk) prøveudtagning tidligt i optagelsesfasen giver data til beregning af teststoffets assimilering i foder, som kan sammenholdes med den assimileringseffektivitet, der beregnes ud fra data fra udskillelsesfasen.
([4]) Der kan udtages fem ekstra fisk til vævsspecifik analyse.
([5]) Der kan være behov for yderligere tre fisk til analyse af fedtindhold, hvis det ikke er muligt at bruge samme fisk som dem, der blev udtaget til måling af stofkoncentrationer ved testens start, optagelsesfasens slutning og udskillelsesfasens afslutning. Det skal bemærkes, at det i mange tilfælde burde være muligt kun at bruge tre kontrolfisk (jf. punkt 56 og 153).

Bemærkning vedrørende tidsplan for faser og prøveudtagning: Optagelsesfasen begynder ved første fodring med spiked foder. En forsøgsdag kører fra en fodring indtil kort før den næste, 24 timer senere. Den første prøveudtagning (1 i tabellen) bør finde sted umiddelbart før den første fodring (f.eks. en time). Prøveudtagning under en undersøgelse bør ideelt set ske kort før den følgende dags fodring (dvs. ca. 23 timer efter fodringen på prøveudtagningsdagen). Optagelsesfasen slutter kort før den første fodring med ikke-spiked foder, hvor udskillelsesfasen begynder (fiskene i testgruppen fordøjer sandsynligvis stadig det spikede foder i de mellemliggende 24 timer efter den sidste fodring med spiked foder). Det betyder, at der bør udtages en prøve ved optagelsesfasens slutning, kort tid før den første fodring med ikke-spiked foder, og den første prøve i udskillelsesfasen bør udtages ca. 23 timer efter den første fodring med ikke-spiked foder.

▼M7

Tillæg 5

ALMINDELIGE BEREGNINGER

1. Indledning

2. Forudsigelse af optagelsesfasens længde

3. Forudsigelse af udskillelsesfasens længde

4. Sekventiel metode: bestemmelse af udskillelseshastighedskonstanten k2

5. Sekventiel metode: bestemmelse af *optagelseshastighedskonstanten* k1 (kun metoden med eksponering i vand)

6. Samtidig metode til beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse (tab) (kun metoden med eksponering i vand)

7. Korrigering for vækstfortynding for kinetisk BCF og BMF

8. Lipidnormalisering til 5 % fedtindhold (kun for metoden med eksponering i vand)

1. INDLEDNING

Den almindelige model for fisk med bioakkumulering i vand kan beskrives i optagelses- og tabsprocesser, idet der ses bort fra optagelse fra foder. Den differentialligning (dC_f/dt), der beskriver ændringer i koncentrationen i fisk ($mg \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$) fås ved (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Ligning A5.1]}$$

hvor

k_1 = Konstant af første orden for optagelse i fisk ($l \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$).

k_2 = Konstant af første orden for udskillelse fra fisk (dag^{-1}).

k_g = Konstant af første orden for fisks vækst (»vækstfortynding«) (dag^{-1})

k_m = Konstant af første orden for metabolisk transformation (dag^{-1}).

k_e = Konstant af første orden for fækal egestion (dag^{-1}).

C_w = Koncentration i vand ((mg·l-1).

C_f = Koncentration i fisk ($mg \cdot kg^{-1}$ vådvægt).

For bioakkumulerende stoffer kan det forventes, at et tidsvægtet gennemsnit (TWA) er den mest relevante eksponeringskoncentration i vand (C_W) inden for det tilladte udsving (jf. punkt 24). Det anbefales at beregne et TWA for koncentration i vand ved hjælp af proceduren i tillæg 6 til TM C.20 (2). Det skal bemærkes, at ln-transformationen af vandkoncentrationen er velegnet, når der forventes et eksponentielt henfald mellem fornyelsesperioder, f.eks. i et semistatisk testdesign. I et gennemstrømningssystem er der ikke nødvendigvis behov for ln-transformation af eksponeringskoncentrationer. Hvis der udledes TWA-vandkoncentrationer, bør disse rapporteres og anvendes i efterfølgende beregninger.

I en standardtest for BCF i fisk kan optagelse og udskillelse beskrives som to kinetiske processer af første orden.

▼M7

Optagelseshastighed = $k_1 \times C_w$ [Ligning A5.2]

Generel tabshastighed = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Ligning A5.3]

Ved ligevægt, og hvor det antages, at vækst og metabolisme er ubetydelig (dvs. værdierne for k_g og k_m ikke kan skelnes fra nul), svarer optagelseshastigheden til udskillelseshastigheden, og ved at kombinere ligning A5.2 og ligning A5.3 fås derfor følgende forhold:

$$BCF = \frac{C_{f\ -\ SS}}{C_{w\ -\ SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Ligning A5.4]

hvor

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentration i fiskene ved ligevægt (mg kg^{-1} vådvægt):

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentration i vand ved ligevægt (mg l^{-1}).

Forholdet k_1/k_2 er kendt som den kinetiske BCF (BCF_K) og bør svare til ligevægts-BCF (BCF_{SS}) hidrørende fra forholdet mellem ligevægtskoncentrationen i fisk og i vand, men afvigelser kan forekomme, hvis ligevægtstilstanden var usikker, eller hvis der er korrigeret for vækst på kinetisk BCF. Men da k_1 og k_2 er konstanter, er ligevægt ikke et krav for at udlede en BCF_K.

På grundlag af disse førsteordensligninger omfatter tillæg 5 de generelle beregninger, som er nødvendige i både bioakkumuleringsmetoden med eksponering i vand og i foder. Afsnit 5, 6 og 8 er dog kun relevante for metoden med eksponering i vand, men er medtaget her, da der er tale om »generelle« teknikker. Den sekventielle metode (afsnit 4 og 5) og den samtidige metode (afsnit 6) kan benyttes til at beregne de optagelses- og udskillelseskonstanter, som anvendes til at udlede kinetiske BCF-værdier. Den sekventielle metode til at bestemme k_2 (afsnit 4) er vigtig for metoden med eksponering i foder, da den er nødvendig for at kunne beregne både assimileringseffektivitet og BMF. Tillæg 7 indeholder nærmere oplysninger om de beregninger, der er specifikke for metoden med eksponering i foder.

2. FORUDSIGELSE AF OPTAGELSESFASENS LÆNGDE

Før testen udføres, kan man ud fra en empirisk sammenhæng mellem k_2 og *n*-octanol/vand-fordelingskoefficienten (K_{OW}) eller k_1 og BCF foretage et skøn over k_2 og dermed en procentdel af den tid, det vil kræve at opnå ligevægt. Det skal dog bemærkes, at ligningerne i dette afsnit kun gælder, når optagelse og udskillelse følger førsteordenskinetik. Hvis dette tydeligvis ikke er tilfældet, anbefales det at søge råd hos en biostatistiker og/eller en farmakokinetiker, hvis det er ønskeligt at forudsige optagelsesfasen.

Et skøn over k_2 (dag^{-1}) kan udarbejdes efter flere forskellige metoder. Eksempelvis kan følgende empiriske sammenhænge anvendes i første instans ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3), ligning A5.5]

Eller

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Ligning A5.6]

hvor $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ ((for stoffer med en log $K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$)[(4), Ligning A5.7]

([1]) Som det er tilfældet med alle empiriske sammenhænge, bør det kontrolleres, at teststoffet falder ind under anvendelsesområdet for forholdet.

▼M7

Og $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2= 0,90)[(5), ligning A5.8]

W = gennemsnitlig fiskevægt (gram vådvægt) ved slutningen af optagelsesfasen/starten på udskillelsesfasen ([1])

Der henvises til (6) for andre dermed relaterede forbindelser. Det kan være en fordel at anvende mere komplicerede modeller i forbindelse med ansættelsen af k_2; der kan f.eks. sandsynligvis forekomme betydelig metabolisme (7) (8). Men i takt med at modellen bliver mere og mere kompleks, bør der udvises større omhyggelighed i fortolkningen af hypoteserne. Tilstedeværelsen af nitrogrupper kan f.eks. være tegn på hurtig metabolisme, men dette er ikke altid tilfældet. Derfor bør brugeren afveje resultaterne af den prognostiske metode mod kemisk struktur og eventuelle andre relevante oplysninger (f.eks. forundersøgelser) i planlægningen af en undersøgelse.

Den tid, der går, til der indtræffer en bestemt procent ligevægt, kan beregnes ved at anvende k_2-skønnet ud fra den generelle kinetiske ligning, der beskriver optagelse og udskillelse (førsteordenskinetik), hvis det antages, at der kun er ubetydelig vækst og metabolisme: Hvis der forekommer betydelig vækst i løbet af undersøgelsen, er nedenstående skøn ikke pålidelige. I så fald er det bedre at bruge den vækstkorrigerede k_{2g} som beskrevet senere (se afsnit 7 i dette tillæg):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Ligning A5.9]}$$

eller, hvis C_w er konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ligning A5.10]}$$

Når der er næsten ligevægt (t → ∞), kan ligning A5.10 reduceres (jf. (9)(10)) til:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Ligning A5.11]}$$

eller

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Ligning A5.12]}$$

Derefter er BCF × C_w en tilnærmelse til koncentrationen i fiskene ved ligevægt ($C_{f\text{-}SS}$). [Bemærk: samme fremgangsmåde kan anvendes ved ansættelsen af ligevægts-BMF i metoden med eksponering i foder. I dette tilfælde erstattes BCF med BMF og C_w med C_{food}, koncentration i foderet, i ovenstående ligninger]

Ligning A5.10 kan omskrives til:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ligning A5.13]}$$

eller

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ligning A5.14]}$$

Ved at anvende ligning A5.14 kan man forudsige, hvor lang tid der går, indtil en vis procent af ligevægt er nået, når A5 allerede er skønnet ved hjælp af ligning A5.5 eller A5.6.

Som rettesnor kan anføres, at den statistisk optimale længde af optagelsesfasen, når der ønskes statistisk acceptable data (BCF_K), er den tid, der går, indtil kurven over logaritmen til koncentrationen af teststoffet i fiskene plottet

([1]) Fiskenes vægt ved optagelsesfasens afslutning kan skønnes ud fra tidligere undersøgelsesdata eller viden om testartens sandsynlige stigning i størrelse fra en typisk vægt ved teststart over en typisk optagelsesfase (f.eks. 28 dage).

▼M7

mod tiden har nået mindst 50 % ligevægt (dvs. 0,69/k_2), men ikke over 95 % af ligevægt (dvs. 3,0/k_2) (11). Hvis ophobningen overstiger 95 % ligevægt, kan en BCF_{SS} beregnes.

Den tid, det tager at nå 80 % ligevægt (ved hjælp af ligning A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ligning A5.15]}$$

eller

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Ligning A5.16]}$$

På samme måde er den tid, det tager at nå 95 % ligevægt:

$$t_{95} = \frac{-\,ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Ligning A5.17]}$$

Eksempelvis er optagelsesfasens længde (dvs. tiden indtil der indtræder en vis procentdel ligevægt, f.eks. t_{80} og t_{95}) for et teststof med log K_{OW} = 4 (ved hjælp af ligning A5.5, ligning A5.16 og ligning A5.17):

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dag}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \textit{ dage } (\textit{59 timer})$$

eller $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60 \textit{ dage } (\textit{59 timer})$

Alternativt kan udtrykket:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{ow} + 55{,}31(\textit{timer}) \qquad \text{[Ligning A5.18]}$$

benyttes til beregning af, hvor lang tid der går til faktisk ligevægt (t_{eSS})(12). For et teststof med log K_{OW} = 4 resulterer dette i:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \textit{ timer}$$

3. FORUDSIGELSE AF UDSKILLELSESFASENS LÆNGDE

Ud fra den generelle ligning, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik), kan man ligeledes forudsige, hvor lang tid der kræves for, at legemsbelastningen falder til en vis procentdel af begyndelseskoncentrationen, jf. Ligning A5.9 (1) (13).

I udskillelsesfasen antages det, at C_W (eller C_{FOOD} for testen med foder) er nul. Ligningen kan da reduceres til:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Ligning A5.19]}$$

eller

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ligning A5.20]}$$

hvor $C_{f,0}$ er koncentrationen ved udskillelsesperiodens begyndelse.

50 % udskillelse vil da være nået på tidspunktet (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

eller

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Tilsvarende vil 95 % udskillelse være nået ved:

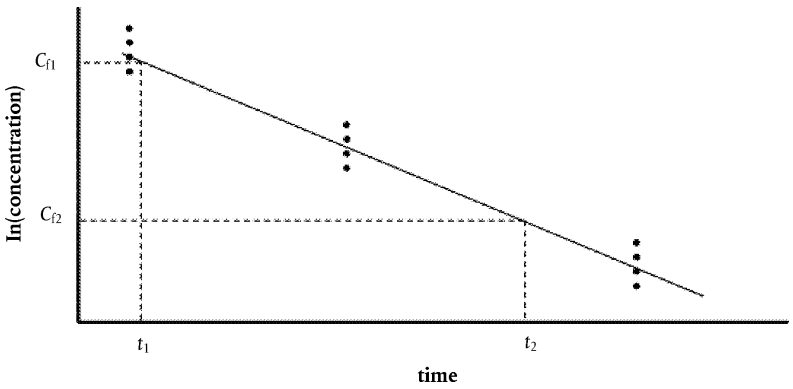
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Hvis der i den første periode benyttes 80 % optagelse ($1{,}6/k_2$), og der i udskillelsesfasen benyttes 2 % tab ($3{,}0/k_2$), bliver udskillelsesfasen omtrent dobbelt så lang som optagelsesfasen.

Det skal bemærkes, at skønnene er baseret på antagelsen om førsteordenskinetik for optagelse og udskillelse. Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, er disse skøn ikke gyldige.

4. SEKVENTIEL METODE: BESTEMMELSE AF UDSKILLELSESHASTIGHEDSKONSTANTEN K_2

De fleste biokoncentreringsdata antages at kunne beskrives »rimelig« godt ved en simpel model med to dele (»compartments«) og to parametre, hvilket fremgår af den retlinede kurve gennem punkterne for koncentrationen i fisk (på en ln-skala) i udskillelsesfasen.



Det skal bemærkes, at afvigelser fra en ret linje kan tyde på, at udskillelsens kinetik er mere kompleks end første orden. Den grafiske metode kan anvendes til løsning af udskillelse, der afviger fra førsteordenskinetik.

Til beregning af k_2 for flere tidspunkter (stikprøver) foretages der en lineær regression af ln(koncentration) i forhold til tid. Regressionslinjens hældning er et estimat af udskillelseshastighedskonstanten k_2 ([1]). Ud fra skæringspunktet kan den gennemsnitlige koncentration i fiskene ved udskillelsesfasens begyndelse ($C0_d$, som svarer til den gennemsnitlige koncentration i fiskene ved optagelsesfasens afslutning) let beregnes (inklusive fejlmargener) ([1]):

([1]) I de fleste programmer, der muliggør lineær regression, gives der også standardfejl og konfidensinterval (CI) for skønnene, f.eks. i Microsoft Excel ved hjælp af værktøjspakken Data Analysis.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[Ligning A5.21]}$$

For at beregne k_2, hvis der kun er to tidspunkter (stikprøver) til rådighed (som i den begrænsede model), erstattes de to gennemsnitskoncentrationer i følgende ligning

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{f1})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_2\ -t_1} \qquad \text{[Ligning A5.22]}$$

hvor $\ln(C_{F1})$ og $\ln(C_{F2})$ er de naturlige logaritmer til koncentrationer på henholdsvis tidspunkt t_1 og t_2, og t_2 og t_1 er de tidspunkter, hvor de to prøver for begyndelsen af udskillelsesfasen blev udtaget ([1]).

5. SEKVENTIEL METODE: BESTEMMELSE AF OPTAGELSESHASTIGHEDSKONSTANTEN K_1 (KUN METODEN MED EKSPONERING I VAND)

For at finde en værdi for k_1 ud fra et bestemt sæt sekventielle koncentrationsdata for optagelsesfasen benyttes software til fitning af følgende model:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ligning A5.23]}$$

hvor k_2 er givet ved den tidligere beregning, og $C_f\ (t)$ og $C_w\ (t)$ er koncentrationerne i henholdsvis fisk og vand på tidspunktet t.

Til at beregne k_1, når der kun er to tidspunkter (stikprøver) til rådighed (som i den begrænsede model), benyttes følgende formel:

$$k_1 = \frac{C_f\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Ligning A5.24]}$$

hvor k_2 er givet ved den tidligere beregning, C_f er koncentrationen i fisk ved udskillelsesfasens begyndelse, og C_w er den gennemsnitlige koncentration i vandet i optagelsesfasen ([2]).

Visuel inspektion af hældningerne k_1 og k_2, når de plottes mod de målte prøveudtagningspunktdata, kan anvendes til at vurdere graden af egnethed. Hvis det viser sig, at sekvensmetoden har givet et dårligt skøn for k_1, bør man anvende den samtidige tilgang til at beregne k_1 og k_2 (se næste afsnit 6). Også her bør de deraf fremkomne hældninger sammenholdes med de plottede, målte data med henblik på visuel vurdering af graden af egnethed. Hvis graden af egnethed fortsat er ringe, kan dette være en indikation af, at førsteordenskinetik ikke finder anvendelse, og at andre mere komplekse modeller bør anvendes.

6. SAMTIDIG METODE TIL BEREGNING AF HASTIGHEDSKONSTANTERNE FOR OPTAGELSE OG UDSKILLELSE (TAB) (KUN METODEN MED EKSPONERING I VAND)

Der kan anvendes software til at finde værdier for k_1 og k_2 ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og følgende model:

$$C_f = C_w\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Ligning A5.25]}$$

$$C_f = C_w\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t\ -t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Ligning A5.26]}$$

hvor

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen.

Denne tilgang giver direkte standardfejl for skønnene af k_1 og k_2. Når k_1/k_2 erstattes med BCF (jf. ligning A5.4) i ligning A5.25 og ligning A5.26, kan standardfejlen og et 95 % konfidensinterval for BCF anslås. Det er især nyttigt ved sammenligning af forskellige skøn på grund af transformation af

([1]) I modsætning til metoden med lineær regression giver denne formel ikke en standardfejl for k_2.

([2]) I modsætning til en procedure med lineær fitning vil denne metode normalt ikke give en standardfejl eller et konfidensinterval for den anslåede k_1.

▼M7

data. Den afhængige variabel (koncentration i fisk) kan fittes med eller uden ln transformation, og den deraf følgende BCF-usikkerhed kan fastslås.

Eftersom der består en stærk korrelation mellem de to parametre k_1 og k_2, hvis de skønnes samtidigt, er det undertiden bedst først at beregne k_2 ud fra udskillelsesdataene alene (se ovenfor); i de fleste tilfælde kan k_2 beregnes ud fra optagelseskurven med relativt stor sikkerhed. k_1 kan efterfølgende beregnes ved hjælp af ikke-lineær regression ([1]). Det tilrådes at anvende samme datatransformation ved sekventiel fitning.

Visuel inspektion af de deraf afledte hældninger kan, når de plottes mod de målte prøveudtagningspunktdata, anvendes til at skønne graden af egnethed. Hvis det viser sig, at denne metode har givet et dårligt skøn for k_1, kan den samtidige tilgang anvendes til at beregne k_1 og k_2. Også her bør den fittede model sammenholdes med de afsatte målte data for visuel inspektion af graden af egnethed, og de deraf følgende parameterskøn for $k1$, k_2 og den deraf følgende BCF samt deres standardafvigelser og/eller konfidensintervaller bør sammenlignes for forskellige fitningstyper.

Hvis graden af egnethed er ringe, kan dette være en indikation af manglende førsteordenskinetik, og at andre mere komplekse modeller bør anvendes. En af de mest almindelige komplikationer er fiskevækst under testen.

7. KORRIGERING FOR VÆKSTFORTYNDING FOR KINETISK BCF OG BMF

I dette afsnit beskrives en standardmetode til at korrigere for fiskenes vækst under testen (såkaldt »vækstfortynding«), som kun er gyldig ved førsteordenskinetik. Hvis der er tegn på, at kinetikken ikke er af første orden, anbefales det at søge råd hos en biostatistiker vedrørende korrekt korrigering for vækstfortynding eller at anvende den nedenfor beskrevne massebaserede fremgangsmåde.

I nogle tilfælde er denne metode til at korrigere for vækstfortynding upræcis, og undertiden virker den ikke (for stoffer, der udskilles meget langsomt, og som der testes i hurtigt voksende fisk, kan den afledte udskillelseshastighedskonstant korrigeret for vækstfortynding, k_{2g}, f.eks. være meget lille, og dermed bliver fejlprocenten i de to hastighedskonstanter, der bruges til at udlede den, kritisk, og i nogle tilfælde kan skøn over k_g overstige skøn over k_2). I sådanne tilfælde kan der anvendes en alternativ metode (dvs. massetilgang), som også fungerer, når vækstkinetikken ikke er af første orden, hvilket fjerner behovet for korrigering. Denne fremgangsmåde er beskrevet i slutningen af dette afsnit.

Metode til subtraktion af vækshastighedskonstant med henblik på vækstkorrektion

Ved standardmetoden konverteres alle individuelle vægt- og længdedata til naturlige logaritmer, og ln(vægt) eller ln(1/vægt) plottes mod tid (dag), behandlings- og kontrolgrupper hver for sig. Samme proces gennemføres med data fra henholdsvis optagelses- og udskillelsesfasen. Generelt er det

([1]) Det er vigtigt at forstå, at den usikkerhed, der er forbundet med skønnet over k_2, ikke anvendes korrekt i bioakkumuleringsmodellen, når den i vid udstrækning betragtes som konstant, når k_1 ittes i den sekventielle fitningsmetode. Den deraf følgende usikkerhed for BCF-værdien vil derfor ikke være den samme for den samtidige og den sekventielle fitningsmetode.

▼M7

for korrigering for vækstfortynding mere hensigtsmæssigt at anvende vægtdata fra hele undersøgelsen for at udlede væksthastighedskonstanten (k_g), men statistisk signifikante forskelle mellem væksthastighedskonstanterne for optagelsesfasen og udskillelsesfasen kan indikere, at konstanten for udskillelsesfasen skulle have været anvendt. De samlede vækstrater fra undersøgelser med eksponering i vand for test- og kontrolgrupper kan anvendes til at kontrollere alle behandlingsrelaterede virkninger.

En lineær mindste kvadraters korrelation beregnes for ln(vægt) i forhold til dag (og for ln(1/vægt) i forhold til dag) for hver gruppe (test- og kontrolgrupper, individuelle data, ikke daglige gennemsnitsværdier) for hele undersøgelsen, optagelses- og udskillelsesfasen ved hjælp af statistiske metoder. Afvigelserne i kurvernes hældninger beregnes og anvendes til at vurdere den statistiske signifikans (p = 0,05) af forskellen mellem hældninger (væksthastighedskonstanter) ved hjælp af t-testen (eller ANOVA, hvis der testes mere end en koncentration). Vægtdata foretrækkes generelt til vækstkorrektion. Længdedata, der er behandlet på samme måde, kan bruges til at sammenligne kontrol- og testgrupper med hensyn til behandlingsrelaterede virkninger. Hvis der ikke er nogen statistisk signifikant forskel i analysen af vægtdata, kan test- og kontroldata samles og en overordnet væksthastighedskonstant for undersøgelsen (k_g) beregnes som den lineære korrelations samlede hældning. Hvis der observeres statistisk signifikante forskelle, rapporteres væksthastighedskonstanter for hver fiskegruppe og/eller undersøgelsesfase hver for sig. Hastighedskonstanten fra hver behandlet gruppe bør efterfølgende anvendes til at korrigere for vækstfortynding i denne gruppe. Hvis der konstateres statistiske forskelle mellem optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter, bør hastighedskonstanter udledt fra udskillelsesfasen anvendes.

Den beregnede væksthastighedskonstant (k_g udtrykt som dag^{-1}) kan trækkes fra den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2) og giver så udskillelseshastighedskonstanten k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Ligning A5.27]}$$

Optagelseshastighedskonstanten divideres med den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant og giver den vækstkorrigerede kinetiske BCF, benævnt BCF_{Kg} (eller BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Ligning A5.28]}$$

Væksthastighedskonstanten udledt fra en undersøgelse af eksponering i foder anvendes i ligning A7.5 til at beregne den vækstkorrigerede BMF_{Kg} (jf. tillæg 7).

Massebaseret metode til vækstkorrektion

Et alternativ til ovennævnte »metode til subtraktion af væksthastighedskonstant«, hvor der ikke er behov for at korrigere for vækst, kan anvendes som følger: Princippet er at anvende udskillelsesdata på massebasis pr. hel fisk i stedet for på et koncentrationsgrundlag.

Vævskoncentrationer fra udskillelsesfasen (masse af teststof/fiskemasseenhed) konverteres til masse af teststof/fisk: koncentrationer og de enkelte fisks vægt opstilles i tabelform (f.eks. ved hjælp af et elektronisk regneark), og hver koncentration multipliceres med fiskenes samlede vægt, således at denne måling giver et sæt masseteststof/fisk for alle prøver fra udskillelsesfasen.

Den deraf resulterende naturlige logaritme for stofmassedata plottes mod tid for forsøget (udskillelsesfasen), som man normalt ville gøre.

▼M7

For metoden med eksponering i vand udledes optagelseshastighedskonstanten rutinemæssigt (se afsnit 4 og 6). Det bemærkes, at den »normale« k_2-værdi bør anvendes i kurvefitningsligningerne for k_1, og hastighedskonstanten udledes af ovennævnte data. Fordi den fremkomne værdi for udskillelseshastighedskonstanten er uafhængig af vækst, fordi den er beregnet ud fra et massegrundlag pr. hel fisk, bør den benævnes k_{2g} og ikke k_2.

8. LIPIDNORMALISERING TIL 5 % FEDTINDHOLD (KUN FOR METODEN MED EKSPONERING I VAND)

BCF-resultater (kinetisk og ligevægt) fra test med eksponering i vand bør også anføres i forhold til et standardfedtindhold på 5 % vådvægt, medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv (f.eks. kan visse perflourinerede stoffer binde til proteiner). Data for koncentration i fisk, eller BCF, skal konverteres til et 5 % fedtindhold på vådvægtsbasis. Hvis de samme fisk er anvendt til at måle stofkoncentrationer og fedtindhold ved alle prøveudtagningspunkter, kræver dette, at hver enkelt målte koncentration i fisk korrigeres for dette fedtindhold.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Ligning A5.29]}$$

hvor

$C_{f,L}$ = lipidnormaliseret koncentration i fisk (mg kg^{-1} vådvægt)

L = lipidfraktion (baseret på vådvægt)

C_f = koncentration af teststof i fisk (mg kg^{-1} vådvægt)

Hvis der ikke er foretaget en fedtanalyse på alle udtagne fisk, anvendes en gennemsnitlig middelværdi for fedtindhold til at normalisere BCF. Til ligevægts-BCF bør den middelværdi, der er registreret ved afslutningen af optagelsesfasen, bruges i behandlingsgruppen. Til normaliseringen af en kinetisk BCF kan der være tilfælde, hvor en anden tilgang er berettiget, f.eks. hvis fedtindholdet har ændret sig markant under optagelses- eller udskillelsesfasen. En fodermængde, der minimerer dramatiske ændringer i fedtindholdet, bør dog under alle omstændigheder anvendes rutinemæssigt.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Ligning A5.30]}$$

hvor

BCF_{KL} = lipidnormaliseret kinetisk BCF, (L kg^{-1})

L_n = gennemsnitlig lipidfraktion (baseret på vådvægt)

BCF_K = kinetisk BCF (L kg^{-1})

LITTERATUR

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna Reproduction Test*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼M7

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Tillæg 6

LIGNING TIL TEST MED EKSPONERING I VAND: BEGRÆNSET TESTDESIGN

Begrundelsen for denne fremgangsmåde er, at biokoncentreringsfaktoren i en komplet test enten kan bestemmes som en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{SS}) ved at beregne forholdet mellem teststoffets koncentration i fiskenes væv og i vand, eller ved at beregne den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_K) som forholdet mellem optagelseshastighedskonstanten k_1 og udskillelseshastighedskonstanten k_2. BCF_K er gyldig, selv om et stofs ligevægtskoncentration ikke opnås under optagelsesfasen, forudsat at optagelse og udskillelse omtrent fungerer i henhold til kinetiske processer af første orden.

Hvis stoffets koncentration i væv (Cf_1) måles på det tidspunkt, hvor eksponeringen afsluttes (t_1), og koncentrationen i væv (Cf_2) måles igen efter et bestemt tidsrum (t_2), kan hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) anslås ved hjælp af ligning A5.22 i tillæg 5.

Hastighedskonstanten for optagelse, k_1, kan beregnes ved hjælp af ligning A5.23 i tillæg 5 (hvor $C_f = CF_{fl}$ og $t = t_1$) (1). Den kinetiske biokoncentreringsfaktor i det begrænsede testdesign (betegnet BCF_{Km} for at skelne den fra kinetiske biokoncentreringsfaktorer, der bestemmes ved hjælp af andre metoder), er derfor:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ligning A6.1]}$$

Koncentrationer eller resultater bør korrigeres for vækstfortynding og normaliseres til et fedtindhold på 5 % som beskrevet i tillæg 5.

Den minimerede BCF_{SS} er BCF beregnet ved afslutningen af optagelsesfasen, idet det forudsættes, at der er indtruffet ligevægt. Dette kan kun være et skøn, da antallet af prøveudtagningspunkter ikke er tilstrækkelige til at dokumentere dette.

$$\text{minimeret BCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Ligning A6.2]}$$

hvor

$C_{f\text{-}minSS}$ = Koncentration i fisk ved anslået ligevægt ved slutningen af optagelsesfasen (mg kg^{-1} vådvægt)

$C_{w\text{-}minSS}$ = Koncentration i vand ved anslået ligevægt ved slutningen af optagelsesfasen (mg l^{-1})

LITTERATUR

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Tillæg 7

LIGNING FOR TEST MED EKSPONERING I FODER

1. Eksempel på mængder af bestanddele i egnet, kommercielt fiskefoder

2. Eksempler på spiking-teknik

3. Beregning af assimileringseffektivitet og biomagnificeringsfaktor

4. Lipidkorrektion

5. Evaluering af forskelle mellem målt nulstillingskoncentration (C0,m) og afledt nulstillingskoncentration (C0,d)

6. Vejledning til meget hurtigt udskilte teststoffer

1. EKSEMPEL PÅ MÆNGDER AF BESTANDDELE I EGNET, KOMMERCIELT FISKEFODER

Hovedbestanddel	Fiskemel
Råprotein	≤ 55,0 %
Råfedt	≤ 15,0 % ([1])
Træstof	≥ 2,0 %
Vandindhold	≥ 12 %
Aske	≥ 8 %

([1]) I nogle regioner kan man muligvis kun få fiskefoder med en fedtkoncentration, der slet ikke når op på denne øvre grænse. I så fald bør casestudierne gennemføres med foder med en lavere fedtkoncentration, og fodermængden kan tilpasses tilsvarende for at opretholde fiskenes sundhedstilstand. Foderets fedtindhold bør ikke øges kunstigt ved tilsætning af ekstra olie.

2. EKSEMPLER PÅ SPIKING-TEKNIK

Almindelige bestemmelser

Kontrolfoder bør være fremstillet på nøjagtig samme måde som det spikede foder, men uden teststof.

For at kontrollere koncentrationen i det behandlede foder bør tredobbelte prøver af det doserede foder ekstraheres ved hjælp af en passende ekstraktionsprocedure, og teststoffets koncentration eller radioaktivitet i det ekstraherede foder måles. Der bør påvises høje genfindinger ved analyser (> 85 %) med lav variation mellem prøverne (tre prøvekoncentrationer for stoffet, der udtages ved testens start, bør ikke variere mere end ± 15 % fra middelværdien).

Under testen med eksponering i foder bør der indsamles tre foderprøver til analyse på dag 0 og ved optagelsesfasens afslutning for at bestemme indholdet af teststof i foderet.

Fremstilling af fiskefoder med et flydende testmateriale (rent)

Der fastsættes en nominel måltestkoncentration i det behandlede fiskefoder, f.eks. 500 µg teststof/g foder. En passende mængde (ud fra molmasse eller specifik radioaktivitet) rent teststof tilsættes til en kendt masse fiskefoder i en

▼M7

glasbeholder eller rotationsfordamper. Massen af fiskefoder bør være tilstrækkelig til hele optagelsesfasen (under hensyntagen til behovet for at øge mængden ved hver fodring på grund af fiskenes vækst). Fiskefoderet/teststoffet bør blandes langsomt i løbet af natten (f.eks. ved hjælp af en rotationsmixer eller ved langsom rotation, hvis der anvendes en rotationsfordamper). Det spikede foder bør opbevares under forhold, der gør det muligt at bevare teststoffets stabilitet i foderblandingen (f.eks. på køl).

Fremstilling af fiskefoder med et majs- eller fiskeoliebærestof

Teststoffer i fast form bør males til et fint pulver i en morter. Teststoffer i væskeform kan tilsættes direkte til majs- eller fiskeolien. Prøvestoffet opløses i en kendt mængde majs- eller fiskeolie (f.eks. 5-15 ml). Den doserede olie overføres kvantitativt til en rotationsfordamper af passende størrelse. Den kolbe, der anvendes til at fremstille den doserede olie, bør skylles med to små delprøver olie, og disse hældes i rotationsfordamperen for at sikre, at alt opløst teststof overføres. For at sikre fuldstændig opløsning/opslæmning i olien (eller hvis der bruges mere end et teststof i undersøgelsen) anbringes en mikrorører i kolben, som tilproppes, hvorefter blandingen blandes under hurtig omrøring natten over. En passende mængde fiskefoder (normalt i pilleform) til testen tilsættes rotationsfordamperen, og dennes indhold blandes homogent ved konstant at dreje kolben i mindst 30 minutter, men helst natten over. Derefter opbevares det spikede foder på passende vis (f.eks. i køleskab) for at sikre teststoffets stabilitet i foderet indtil brug.

Fremstilling af fiskefoder med et organisk opløsningsmiddel

En passende mængde teststof (ud fra molmasse eller specifik radioaktivitet), der er tilstrækkelig til at opnå måldosis, opløses i et egnet organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone eller cyclohexan, 10-40 ml, men om nødvendigt en større mængde afhængigt af den fodermængde, der skal spikes). En alikvot af eller hele (tilsat portionsvis) opløsningen blandes med en passende mængde fiskefoder for at nå op på det krævede nominelle dosisniveau. Foderet/teststoffet kan blandes i en rustfri skål, og det nydoserede fiskefoder forblive i skålen i et stinkskab i to dage (med lejlighedsvis omrøring), således at overskydende opløsningsmiddel kan fordampe, eller blandes i en rotationsfordamper med konstant rotation. Det overskydende opløsningsmiddel kan »blæses« af med luft eller nitrogen. Det bør sikres, at teststoffet ikke krystalliserer, når opløsningsmidlet fjernes. Det spikede foder bør opbevares under betingelser, der gør det muligt at bevare teststoffets stabilitet i foderblandingen (f.eks. på køl).

3. BEREGNING AF ASSIMILERINGSEFFEKTIVITET OG BIOMAGNIFICERINGSFAKTOR

For at beregne assimileringseffektiviteten bør den samlede udskillelseshastighedskonstant først bestemmes i henhold til afsnit 4 i tillæg 5 (her anvendes den »sekventielle metode«, dvs. lineær standardregression) ved hjælp af gennemsnitlige prøvekoncentrationer fra udskillelsesfasen. Fodringshastighedskonstanten I og optagelsens varighed t er kendte parametre. C_{food}, den gennemsnitlige målte koncentration af teststoffet i foderet, er en målt variabel i undersøgelsen. $C_{0,\text{d}}$, teststoffets koncentration i fiskene ved optagelsesfasens afslutning, udledes normalt af skæringspunktet mellem en graf over ln(koncentration) mod udskillelsesdag.

Stoffets assimileringseffektivitet (a, absorption af teststoffet i tarmen) beregnes som:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Ligning A7.1]}$$

hvor:

$C_{0,d}$ = udledt koncentration i fisk ved nulstilling af udskillelsen (mg kg^{-1})

▼M7

k_2 = samlet (ikke vækstkorrigeret) udskillelseshastighedskonstant (dag^{-1}), beregnet efter ligningerne i tillæg 5, afsnit 3

I = hastighedskonstant for foderindtagelse (g fødevarer g^{-1} fisk dag^{-1}).

C_{food} = koncentration i foder (mg kg^{-1} foder)

t = fordringsperiodens varighed (dag)

Det kan dog blive nødvendigt at tilpasse den fodermængde I, der er anvendt til beregningen, til fiskenes vækst for at give en præcis assimileringseffektivitet, a. I en test, hvor fiskene vokser meget i optagelsesfasen (uden at fodermængden korrigeres for at beholde den fastsatte fodermængde) vil den effektive fodermængde i løbet af optagelsesfasen være lavere end den fastsatte, hvilket vil resultere i en højere »reel« assimileringseffektivitet. (Det skal bemærkes, at dette ikke er vigtigt for den samlede beregning af BMF, da I effektivt ophæves mellem ligning A7.1 og ligning A7.4). Den gennemsnitlige fodermængde korrigeret for vækstfortynding, I_g, kan beregnes på flere forskellige måder, men en enkel og præcis metode er at bruge den kendte vækshastighedskonstant (k_g) til at anslå testfiskenes vægt på forskellige tidspunkter i optagelsesfasen, dvs.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Ligning A7.2]}$$

hvor

$W_f(t)$ = fiskenes gennemsnitlige vægt på optagelsesdag t

$W_{f,0}$ = fiskenes gennemsnitlige vægt ved forsøgets start

På denne måde kan (som minimum) fiskenes gennemsnitlige vægt på den sidste eksponeringsdag ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$) anslås. Da fodermængden er fastsat på baggrund af $W_{f,0}$, kan den effektive fodermængde for hver optagelsesdag beregnes ved hjælp af disse to vægtværdier. Den vækstkorrigerede fodermængde, I_g (g foder g^{-1} fisk dag^{-1}), som kan anvendes i stedet for I i tilfælde af kraftig vækst i optagelsesfasen, kan derefter beregnes som

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[Ligning A7.3]}$$

Når assimileringseffektiviteten er opnået, kan BMF beregnes ved at multiplicere den med fodringshastighedskonstanten I (eller I_g, hvis denne er anvendt til at beregne α) og dividere resultatet med den samlede udskillelseshastighedskonstant k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Ligning A7.4]}$$

Den vækstkorrigerede biomagnificeringsfaktor bør også beregnes på samme måde under anvendelse af den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (som udledt i henhold til punkt 7 i tillæg 5). Hvis I_g er anvendt til at beregne α, bør den også anvendes her i stedet for I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Ligning A7.5]}$$

hvor:

α = assimileringseffektivitet (absorption af teststoffet i tarmen)

k_2 = samlet (ikke vækstkorrigeret) udskillelseshastighedskonstant (dag^{-1}), beregnet efter ligningerne i tillæg 5, afsnit 3

▼M7

k_{2g} = vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant (dag^{-1})

I = hastighedskonstant for foderindtagelse (g fødevarer g^{-1} fisk dag^{-1}).

Den vækstkorrigerede halveringstid ($t_{1/2}$) beregnes som følger:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Ligning A7.6]}$$

Stoffets assimileringseffektivitet fra foderet kan også anslås, hvis vævsrester bestemmes i løbet af optagelsesfasens lineære fase (mellem dag 1 og 3). I dette tilfælde kan stoffets assimileringseffektivitet (α) bestemmes som følger

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Ligning A7.7]}$$

hvor

C_{fish} *(t)* = koncentrationen af teststof i fiskene på tidspunkt t (mg kg^{-1} vådvægt)

4. LIPIDKORREKTION

Hvis fedtindholdet er målt på de samme fisk, som der blev foretaget en kemisk analyse af ved alle prøveudtagningsintervaller, burde de enkelte koncentrationer korrigeres på grundlag af fedtindhold og ln(koncentration, lipidkorrigeret) plottes i forhold til udskillelse (dag) for at beregne $C_{0,d}$ og k_2. Assimileringseffektiviteten (ligning A7.1) kan derefter beregnes på et lipidgrundlag ved at anvende C_{food} på et lipidgrundlag (dvs. at C_{food} multipliceres med den gennemsnitlige lipidfraktion i foderet). Efterfølgende beregning ved hjælp af ligning A7.4 og ligning A7.5 vil give den lipidkorrigerede (og vækstfortyndingskorrigerede) BMF direkte.

I modsat fald udledes lipidfraktionen (vægt/vægt) i fiskene og foderet for både behandlings- og kontrolgruppen (for fisk i foder- og kontrolgruppen sker dette normalt på baggrund af data, der er målt ved eksponeringens begyndelse og ophør. For fisk i behandlingsgruppen sker dette normalt på baggrund af data, der kun er målt efter eksponeringen). I nogle undersøgelser kan fedtindholdet i fiskene stige markant; i sådanne tilfælde er det mere hensigtsmæssigt at anvende en gennemsnitlig fedtkoncentration beregnet ud fra de målte værdier ved eksponeringens og udskillelsens afslutning. Generelt bør kun data fra behandlingsgruppen anvendes til at udlede de to lipidfraktioner.

Lipidkorrektionsfaktoren (L_c) beregnes som:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Ligning A7.8]}$$

hvor L_{fish} og L_{food} er de gennemsnitlige lipidfraktioner i henholdsvis fisk og foder.

Lipidkorrektionsfaktoren anvendes til at beregne den lipidkorrigerede biomagnificeringsfaktor (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Ligning A7.9]}$$

5. EVALUERING AF FORSKELLE MELLEM MÅLT NULSTILLINGSKONCENTRATION ($C_{0,M}$) OG AFLEDT NULSTILLINGSKONCENTRATION ($C_{0,D}$)

Den målte nulstillingskoncentration ($C_{0,m}$) og den afledte nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) bør sammenlignes. Hvis de ligger meget tæt på hinanden, underbygger dette førsteordensmodellen, der blev brugt til at udlede udskillelsesparametrene.

▼M7

I nogle undersøgelser kan der være en markant forskel mellem den afledte nulstillingsværdi, $C_{0,d}$, og den gennemsnitlige målte nulstillingskoncentration. $C_{0,m}$ (jf. sidste led i punktopstillingen i punkt 159 i denne forsøgsmetode). Hvis $C_{0,d}$ er meget lavere end $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), kan forskellen indikere tilstedeværelse af ufordøjet, spiked foder i tarmen. Dette kan efterprøves ved at foretage separate analyser af den fjernede tarm, hvis der er udtaget og opbevaret yderligere prøver (hel fisk) ved optagelsesfasens afslutning. Hvis en statistisk gyldig test for afvigende værdier anvendt på udskillelsesfasens lineære regression indikerer, at det første prøveudtagningspunkt i udskillelsen er fejlagtigt højt, kan det ellers være hensigtsmæssigt at udføre den lineære regression for at udlede k_2, men udelade det første udskillelseskoncentrationspunkt. Hvis usikkerheden i den lineære regression i sådanne tilfælde er kraftigt reduceret, og det står klart, at udskillelseskinetikken var af omtrentlig første orden, kan det være hensigtsmæssigt at anvende de resulterende $C_{0,d}$- og k_2-værdier i beregningen af assimileringseffektiviteten. Dette bør begrundes behørigt i rapporten. Det er også muligt, at kinetikken ikke var af første orden i udskillelsesfasen. Hvis dette er sandsynligt (dvs. at data transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme ser ud til at følge en kurve sammenlignet med den lige, lineære regression), er det usandsynligt, at beregningerne af k_2 og $C_{0,d}$ er gyldige, og der bør søges rådgivning fra en biostatistiker.

Hvis $C_{0,d}$ er langt højere end den målte værdi ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), kan dette være et udtryk for, at stoffet blev udskilt meget hurtigt (dvs. at visse prøveudtagningspunkter nærmede sig analysemetodens kvantificeringsgrænse meget tidligt i udskillelsesfasen, jf. nedenstående afsnit 6), at der var en afvigelse fra udskillelseskinetikken af første orden, at den lineære regression for at udlede k_2 og $C_{0,d}$ er mangelfuld, eller at der opstod et problem med de målte koncentrationer på nogle prøveudtagningstidspunkter i undersøgelsen. I sådanne tilfælde bør grafen over den lineære regression kontrolleres for tegn på prøver ved eller i nærheden af kvantificeringsgrænsen, for ekstremt afvigende værdier og for indlysende krumning (der tyder på, at kinetikken ikke var af første orden), og fremhæves i rapporten. En eventuel efterfølgende revurdering af den lineære regression for at forbedre anslåede værdier bør beskrives og begrundes. Hvis der observeres en markant afvigelse fra førsteordenskinetik, er det usandsynligt, at beregningerne af k_2 og $C_{0,d}$ er gyldige, og det tilrådes at søge rådgivning fra en biostatistiker.

6. VEJLEDNING TIL MEGET HURTIGT UDSKILTE TESTSTOFFER

Som nævnt i forsøgsmetodens punkt 129 kan nogle stoffer udskilles så hurtigt, at det ikke er muligt at udlede en pålidelig nulstillingskoncentration, $C_{0,d}$, og k_2 kan ikke udledes, fordi stoffet i prøver, der er udtaget meget tidligt i udskillelsesfasen (dvs. fra den anden udskillelsesprøve og derefter), reelt ikke længere måles (koncentrationer, der ligger ved kvantificeringsgrænsen). Denne situation blev observeret i den ringtest, der blev udført som støtte for denne forsøgsmetode med benzo[a]pyren, og er dokumenteret i valideringsrapporten vedrørende metoden. I sådanne tilfælde kan den lineære regression ikke udføres sikkert og vil sandsynligvis give et urealistisk højt skøn over $C_{0,d}$, hvilket resulterer i en tilsyneladende assimileringseffektivitet, der er meget større end 1. Det er muligt at anlægge et konservativt skøn over k_2 og en »øvre grænse-BMF« i disse tilfælde.

Anvendes disse datapunkter i udskillelsesfasen, hvor der er målt en koncentration op til og med den første »ikke-registrerbare« koncentration (koncentration fastsat til kvantificeringsgrænsen), giver en lineær regression (ved hjælp af koncentrationsdata transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til tid) et skøn over k_2. I disse tilfælde involverer dette sandsynligvis kun to datapunkter (f.eks. prøvedag 1 og 2 i udskillelsesfasen), og derefter kan k_2 anslås ved hjælp af ligning A5.22 i tillæg 5. Dette skøn over k_2 kan anvendes til at anslå en assimileringseffektivitet i henhold til ligning A7.1, idet $C_{0,d}$-værdien i ligningen med den målte nulstillingskoncentration ($C_{0,m}$) udskiftes i de tilfælde, hvor $C_{0,d}$ klart skønnes at være langt højere, end hvad der kunne opnås i testen. Hvis $C_{0,m}$ ikke kan måles, bør

▼**M7**

detektionsgrænsen i fiskevæv anvendes. Hvis dette i nogle tilfælde giver en værdi på $\alpha > 1$, antages assimileringseffektiviteten at være 1 som et »worst case-scenarie«.

Den maksimale BMF_K kan derefter beregnes ved hjælp af ligning A7.4 og bør angives som en »meget mindre end«-værdi (<<). For en undersøgelse med en fodermængde på 3 %, en udskillelseshalveringstid på under tre dage og et »worst case-α« på 1 forventes BMF_K at være under ca. 0,13. I lyset af formålet med dette skøn, og det forhold, at værdier vil være konservative, er det ikke nødvendigt at korrigere dem for vækstfortynding eller fedtindholdet i fisk og foder.

▼M7

Tillæg 8

METODER TIL AT ANSLÅ TENTATIVE BCF-VÆRDIER FRA DATA, DER ER INDSAMLET I UNDERSØGELSEN AF EKSPONERING I FODER

Metoden med eksponering i foder er medtaget i denne forsøgsmetode på grund af bioakkumuleringstesten af stoffer, der i praksis ikke kan testes ved hjælp af metoden med eksponering i vand. Metoden med eksponering i vand giver en biokoncentreringsfaktor, mens metoden med eksponering i foder giver direkte oplysninger om fodringsbiomagnificeringspotentialet. Mange kemiske sikkerhedssystemer indeholder krav om biokoncentrering i vand (f.eks. i forbindelse med risikovurdering og det globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier). Der er således behov for at anvende data fra en undersøgelse af eksponering i foder til at anslå en biokoncentreringsfaktor, der er sammenlignelig med test, der udføres i henhold til metoden med eksponering i vand ([1]). Dette afsnit omhandler metoder hertil, idet det dog erkendes, at der er mangler ved skønnene.

I undersøgelsen af eksponering i foder måles udskillelse for at få en udskillelseshastighedskonstant k_2. Hvis en optagelseshastighedskonstant kan anslås ved hjælp af de tilgængelige data for de tilfælde, hvor fiskene har været udsat for teststoffet i vand, kan man anslå en kinetisk BCF.

Skønnet over en optagelseshastighedskonstant for eksponering for et teststof i vand afhænger af mange antagelser, som alle vil medvirke til at gøre skønnet usikkert. Desuden er denne metode til at anslå en BCF baseret på den antagelse, at den samlede udskillelse (inklusive medvirkende faktorer såsom fordeling i kroppen og individuelle udskillelsesprocesser) er uafhængig af den eksponeringsteknik, der anvendes til at frembringe et teststofs belastning af kroppen.

De væsentligste forudsætninger, som ligger til grund for skønnet, kan sammenfattes som følger:

udskillelse efter indtagelse via føden er den samme som udskillelse efter eksponering for et bestemt stof i vand

optagelse af stoffet fra vand vil følge en førsteordenskinetik.

Afhængigt af den anvendte metode til at anslå optagelse:

— kan optagelse korreleres med fiskenes vægt alene

— kan optagelse korreleres med stoffets octanol-vand-fordelingskoefficient alene

— kan optagelse korreleres med en kombination af fiskenes vægt og stoffets octanol-vand-fordelingskoefficient

— har faktorer, der kan påvirke optagelse i en undersøgelse af eksponering i vand i praksis, såsom et stofs biotilgængelighed, adsorption til apparater, molekylær størrelse osv., kun begrænset effekt

— og mindst lige så vigtigt:

er den database, der bruges til at udvikle metoden til at anslå optagelse, repræsentativ for det pågældende stof.

Flere publikationer i den offentligt tilgængelige litteratur har udledt ligninger for forholdet mellem fisks optagelse fra vand via gællerne og et stofs octanol-vand-fordelingskoefficient, fiskenes vægt (1) (2) (3) (4), mængde og/eller fedtindhold, membrangennemtrængning/-diffusion (5) (6), fiskenes ventilationsvolumen (7) og

([1]) I naturen er den rute, der fører til den største eksponering i vandmiljøer, sandsynligvis gennem indtagelse af meget hydrofobe stoffer, og en anslået BCF er derfor ikke 100 % repræsentativ for et sådant stofs bioakkumuleringspotentiale.

▼M7

via en tilgang med fugasitet/massebalance (8) (9) (10). En detaljeret evaluering af sådanne metoder anvendt i denne forbindelse findes i Crookes & Brooke (11). I en publikation af Barber (12) ligger fokus på modellering af bioakkumulering gennem optagelse via foder, og den kan også være nyttig i denne sammenhæng, da den omfatter bidrag fra modeller med optagelse via gæller. En del af baggrundsdokumentet til foderprotokollen fra 2004 (13) behandler også dette aspekt.

De fleste af disse modeller ser ud til at være udledt på baggrund af begrænsede databaser. For modeller, hvor der foreligger oplysninger om den database, der er anvendt som grundlag, ser det ud til, at den anvendte type stoffer ofte er af samme struktur eller klasse (med hensyn til funktionalitet, f.eks. organiske chlorforbindelser). Dette øger usikkerheden ved at bruge en model til at forudsige en optagelseshastighedskonstant for en anden type stof, ud over testspecifikke hensyn såsom art, temperatur osv.

Det fremhæves i en gennemgang af tilgængelige teknikker (11), at ingen metode er »mere korrekt« end andre. Der bør derfor gives en klar begrundelse for valg af model. Hvis der findes flere forskellige metoder, hvis anvendelse kan begrundes, kan det være fornuftigt at fremlægge flere skøn over k_1 (og dermed over BCF) eller en række af k_1-værdier (og BCF) ifølge flere modeller for skøn over optagelse. I betragtning af forskellene mellem modeltyper og de datasæt, der anvendes til at udvikle dem, vil det ikke være hensigtsmæssigt at tage en gennemsnitsværdi ud fra skøn, der er udledt på forskellige måder.

Nogle forskere har anført, at BCF-skøn af denne type kræver korrigering for biotilgængelighed for at tage hensyn til et stofs adsorption til opløst organisk kulstof (DOC) i forbindelse med eksponering i vand for at bringe skønnet i overensstemmelse med resultater fra undersøgelser af eksponering i vand (f.eks. (13) (14)). Denne korrigering er dog ikke nødvendigvis hensigtsmæssig i betragtning af DOC i en undersøgelse af eksponering i vand for et »worst case-skøn« (dvs. forholdet mellem et biotilgængeligt stof og et stof målt i opløsningsmiddel). For stærkt hydrofobe stoffer kan optagelse gennem gællerne begrænses af den passive diffusion i nærheden af gællens overflade; i dette tilfælde kan korrektionen muligvis tilskrives denne virkning og ikke det, der var formålet med den.

Det anbefales at fokusere på metoder, som kræver input, for hvilke der foreligger data for stoffer, der testes i henhold til den her beskrevne undersøgelse af eksponering i foder (dvs. log *Kow*, fiskenes vægt). Andre metoder, der kræver mere komplekse input, kan anvendes, men bør suppleres med yderligere målinger i testen eller detaljeret viden om teststoffet eller fiskearter, som måske ikke er almindeligt tilgængelig. Desuden kan valg af model påvirkes af valideringsniveauet og anvendelsesområdet (se (11) for en gennemgang og sammenligning af forskellige metoder).

Det skal bemærkes, at det fremkomne skøn over k_1 og den anslåede BCF er usikre og måske bør gøres til genstand for en evidensvægtningsmetode sammen med de afledte BMF-værdier og stofparametre (f.eks. molekylestørrelse) for at danne et samlet billede af et stofs bioakkumuleringspotentiale. Fortolkning og anvendelse af disse parametre kan afhænge af lovrammerne.

LITTERATUR

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL

1. METODE

Denne vækstoksicitetstestmetode svarer til OECD TG 215 (2000).

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på væksten hos fiskeyngel, som gennem længere tid eksponeres for kemikalier. Testen er baseret på en metode, som er udviklet og ringtestet (1)(3) inden for den Europæiske Union med henblik på at vurdere virkningerne af kemikalier på væksten hos yngel af regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) under gennemstrømningsbetingelser. Andre veldokumenterede aner kan anvendes. For eksempel har man erfaring fra vækstest med zebrafisk (Danio rerio) ([1]) (3)(4) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (5)(6)(7).

Der henvises også til den generelle indledning til del C.

1.2. DEFINITIONER

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant virkning ($p < 0,05$) i sammenligning med en kontrolgruppe. Dog skal alle testkoncentrationer over LOEC have en skadevirkning, som er lig med eller større end de virkninger, der er observeret ved LOEC.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

$\mathbf{EC_X}$ er ved denne testmetode den koncentration af testkemikaliet, som forårsager en variation i fiskenes tilvækst på x % i sammenligning med kontrolgrupperne.

Belastningsgraden er fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

Bestandtætheden er antallet af fisk pr. vandvolumen.

Enkeltfisk-specifik tilvækst er et udtryk for en enkelt fisks tilvækst på grundlag af fiskens startvægt.

Beholdergennemsnits-specifik tilvækst er et udtryk for den gennemsnitlige tilvækst for en beholderpopulation ved én koncentration.

Pseudo-specifik tilvækst er et udtryk for den enkelte fisks tilvækst i sammenligning med beholderpopulationens gennemsnitlige startvægt.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Fiskeyngel i den eskponentielle vækstfase vejes og anbringes derefter i testbeholdere og eksponeres for en række subletale koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand, fortrinsvis ved gennemstrømning eller, hvis dette ikke er muligt, under passende semistatiske betingelser (statisk-udskiftning). Testens varighed er 28 dage. Fiskene fodres dagligt. Foderrationen baseres på fiskenes startvægt og kan genberegnes efter 14 dage. Ved testens afslutning vejes fiskene igen. Virkningerne på tilvæksten analyseres ved anvendelse af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en variation i tilvæksten på x %, dvs. EC_X (f.eks. EC_{10}, EC_{20} eller EC_{30}). Alternativt kan dataene sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og derudfra koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).

1.4. INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

Der bør foreligge resultater fra en akut-toksidtetstest (se testmetode C.1), fortrinsvis udført på den art, som er valgt til denne test. Dette indebærer, at testkemikaliets vandopløselighed og damptryk er kendt, og at der foreligger en pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.

Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a, P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

Testens validitet forudsætter følgende:

— mortaliteten i kontrolgruppen(-erne) må ikke overstige 10 % ved testens afslutning

— den gennemsnitlige vægt af fiskene i kontrolgruppen(-erne) skal være øget tilstrækkeligt til, at detektion af den minimale variation i tilvæksten kan betragtes som signifikant. En ringtest (2) har vist, at for regnbueørreders vedkommende skal gennemsnitsvægten for fiskene i kontrolgrupperne i løbet af 28 dage være øget med mindst det halve (dvs. 50 %) af deres gennemsnitlige startvægt; f.eks. startvægt: 1 g/fisk (= 100 %), slutvægt efter 28 dage: ≥ 1,5 g/fisk (≥ 150 %)

— koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af værdien for luftmætning (ASV)

— vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i løbet af testen variere med mere end 1 °C mellem testbeholdeme og skal holdes inden for 2 °C omkring de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 1).

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

— ilt- og pH-måleudstyr

▼B

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

— egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning

— beholdere fremstillet af et kemisk inaktivt materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se 1.8.5 og tillæg 1)

— vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0,5 %).

1.6.2. **Vand**

Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på ± 0,5 pH-enheder. En hårdhedsgrad på over 140 mg/l (som $CaCO_3$) anbefales. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4, pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmet tørstof skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant gennem mindst ét år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med længere intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

1.6.3. **Testopløsninger**

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Mætningssøjler (opløselighedssøjler) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen.

Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløselighedsfremmere) kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid og triethylenglycol. Eksempler på egnede dispergeringsmidler er Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Man skal udvise forsigtighed ved anvendelse af stoffer, der er umiddelbart biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller meget flygtige, idet de ved gennemstrømnmgstest kan give anledning til problemer med bakteriebelægninger. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må dette ikke have nogen signifikant virkning på fiskenes vækst eller synlig negativ virkning på fiskeyngelen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

▼B

Til gennemstrømningstest kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En ringtest (2) har vist, at en vandudskiftningshyppighed på 6 l pr. g fisk pr. døgn i løbet af testen er passende for regnbueørreds vedkommende (se 1.8.2.2).

Til semistatiske (udskiftnings-) test vil medieudskiftningshyppigheden være afhængig af testkemikaliets stabilitet; men det anbefales at udskifte vandet hver dag. Hvis det på baggrund af præliminære stabilitetstest (se 1.4) har vist sig, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. ligger uden for området på 80-120 % af den nominelle værdi, eller under 80 % af den målte startkoncentration) i udskiftningstidsrummet, bør man overveje at anvende en gennemstrømningstest.

1.6.4. **Valg af fiskeart**

Regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) er den anbefalede art til denne test, idet man har mest erfaring fra ringtest med denne art (1)(2). Andre veldokumenterede arter kan dog anvendes; men testproceduren må eventuelt tilpasses, så man opnår de bedst egnede testbetingelser. For eksempel har man også erfaring med zebrafisk (Danio rerio) (3)(4) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (5)(6)(7). En begrundelse for valget af art og testmetode skal i så fald anføres.

1.6.5. **Opbevaring af fiskene**

Testfiskene skal udvælges fra en population af en enkelt bestand, fortrinsvis fra samme gydning, som i mindst to uger forud for testen holdes under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Fiskene skal fodres med en minimumsration på 2 % af kropsvægten pr. dag, og fortrinsvis 4 % af kropsvægten pr. dag, gennem hele opbevaringsperioden og under testen.

Efter en akklimatiseringsperiode på 48 timer registreres mortaliteten, og følgende kriterier bringes i anvendelse:

— mortalitet på mere end 10 % af populationen på syv dage: Hele fiskegruppen kasseres

— mortalitet på mellem 5 % og 10 % af populationen: akklimatisering i yderligere syv dage, og hvis mortaliteten er over 5 % i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— mortalitet på mindre end 5 % af populationen på syv dage: Fiskegruppen godkendes.

I de to uger forud for testen eller under testen bør fiskene ikke behandles for sygdomme.

▼B

1.7. TESTDESIGN

»Testdesignet« vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal beholdere med hvert koncentrationsniveau samt antal fisk pr. beholder. Optimalt bør testedesignet vælges under hensyntagen til:

— undersøgelsens formål

— den anvendte statistiske analysemetode

— forsøgsressourcernes tilgængelighed og pris.

Beskrivelsen af formålet bør, om muligt, angive den statistiske opløsningsgrad, ved hvilken en given forskels-størrelse (f.eks. i tilvækst) skal detekteres, eller alternativt den nøjagtighed, hvormed EC_x (f.eks. hvor x = 10, 20 eller 30, og fortrinsvis ikke mindre end 10) skal beregnes. Dette er en forudsætning for, at undersøgelsens omfang kan fastlægges med sikkerhed.

Det er vigtigt at forstå, at et design, som er optimalt (giver den bedste udnyttelse af ressourcerne) til brug i forbindelse med én statistisk analysemetode, ikke nødvendigvis er optimalt ved en anden metode. Det design, der anbefales til vurdering af LOEC/NOEC, vil derfor ikke være det samme som det, der anbefales til brug ved regressionsanalyse.

I de fleste tilfælde foretrækkes regressionsanalyse frem for variansanalyse, af årsager, som Stephan og Rogers (8) har gjort rede for. Hvor der imidlertid ikke foreligger nogen egnet regressionsmodel, bør ($r^2 < 0,9$) NOEC/LOEC anvendes.

1.7.1. **Design for regressionsanalyse**

Følgende punkter er vigtige at tage i betragtning, når en test skal designes til regressionsanalyse:

— Testen må nødvendigvis omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{10,20,30}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer vil være mest nøjagtig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. En præliminær test til bestemmelse af dette område kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende.

— For at man skal kunne opstille en fyldestgørende statistisk model, skal testen omfatte mindst én kontrolbeholder og fem yderligere beholdere med forskellige koncentrationer. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, og hvor det er aktuelt, bør der i tillæg til testrækken udføres en test på én kontrolbeholder indeholdende opløselighedsfremmeren i den højeste testkoncentration (se 1.8.3 og 1.8.4).

— En passende geometrisk eller logaritmisk progression (9) (se tillæg 3) kan anvendes. Logaritmiske progressioner mellem testkoncentrationerne er at foretrække.

▼B

— Hvis man har mere end seks beholdere til rådighed, bør de ekstra beholdere enten anvendes til replikation eller fordeles inden for koncentrationsområdet, så der bliver mulighed for mindre intervaller mellem niveauerne. Disse to muligheder er lige ønskelige.

1.7.2. **Design for vurdering af NOEC/LOEC ved anvendelse af variansanalyse (ANOVA)**

Fortrinsvis bør der være replikatbeholdere for hver enkelt koncentration, og statistiske analyser bør foretages på beholderniveau (10). Hvis man ikke har replikatbeholdere, kan man ikke tage højde for variabiliteten mellem beholdere, ud over hvad der må tilskrives enkeltfisk. Man har imidlertid erfaret (11), at variabiliteten mellem beholdere har været meget lille i sammenligning med variabiliteten inden for beholderen (dvs. mellem enkeltfisk) i det undersøgte tilfælde. Det er derfor et relativt acceptabelt alternativ at udføre statistisk analyse på enkeltfiskniveau.

Normalt anvendes mindst fem testkoncentrationer i en geometrisk progression med en faktor, som ikke overstiger 3.2.

Når testene udføres med replikatbeholdere, bør antallet af replikatkontrolbeholdere, og dermed antallet af fisk, almindeligvis være det dobbelte for hver af testkoncentrationerne, som bør omfatte samme antal (12)(13)(14). Hvis man derimod ikke har replikatbeholdere, bør der være lige så mange fisk i kontrolgruppen som i hver af restkoncentrationerne.

Hvis ANOVA skal baseres på beholdere i stedet for enkeltfisk (hvilket vil indebære enten, at hver enkelt fisk skal mærkes, eller anvendelse af »pseudo«-specifik tilvækst (se 2.1.2)), vil det være nødvendigt med tilstrækkeligt mange replikatbeholdere til, at standardafvigelsen for »beholdere inden for koncentrationerne« kan bestemmes. Dette betyder, at fejlfrihedsgraden i variansanalysen bør være mindst fem (10). Hvis kun kontrolgrupperne replikeres, vil der være en risiko for skævhed i fejlvariabiliteten, idet denne kan stige, når middelværdien for den pågældende tilvækst stiger. Eftersom det er sandsynligt, at tilvæksten vil falde, når koncentrationen øges, vil dette give en tilbøjelighed til overvurdering af variabiliteten.

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Udvælgelse og vejning af testfisk**

Det er vigtig: a: minimere variationen i fiskenes vægt ved testens begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test. er angivet i tillæg 1. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for individuel vægt ved testens begyndelse ideelt bør holdes inden for ± 10 % af gennemsnitsvægten og må under ingen omstændigheder overstige 25 %. Det anbefales at veje en delprøve af fisk inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

▼B

Stampopulationen bør ikke fodres i 24 timer forud for testens begyndelse. Derpå bør fiskene vælges tilfældigt. Ved anvendelse af et totalbedøvende middel (f.eks. en vandig opløsning af 100 mg/l tricainmethansulfonat (MS 222) neutraliseret ved tilsætning af to dele natriumbicarbonat pr. del MS 222) bør fiskene vejes enkeltvis som vådvægt (duppes tørre) med den nøjagtighed, som er anført i tillæg 1. De fisk, hvis vægt ligger inden for det ønskede område, tages fra og fordeles derpå tilfældigt mellem testbeholderne. Den samlede vådvægt af fisk i hver testbeholder registreres. Både anvendelsen af bedøvelsesmidlet og håndteringen af fiskene (herunder aftørring og vejning) kan give anledning til stress og beskadigelser af fiskeyngelen, i særdeleshed hvor det drejer sig om de arter, der er små af størrelse. Derfor skal håndteringen af fiskeyngelen foretages med den yderste forsigtighed for at undgå at stresse og beskadige testfiskene.

Fiskene vejes igen på testens 28. dag (se 1.8.6). Hvis det imidlertid skønnes nødvendigt at genberegne foderrationen, kan fiskene vejes igen på testens 14. dag (se 1.8.2.3). Andre metoder, som f.eks. en fotografisk metode, vil kunne anvendes for at bestemme ændringer i fiskenes størrelse, og foderrationerne vil så kunne justeres ud fra dette.

1.8.2. **Eksponeringsbetingelser**

1.8.2.1. *Varighed*

Testens varighed er ≥ 28 dage.

1.8.2.2. *Belastningsgrad og bestandtæthed*

Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 1). Hvis bestandtætheden er for stor, vil der opstå stress på grund af trængsel, hvilket vil føre til reduceret tilvækst og øget risiko for sygdomme. Hvis bestandtætheden er for lav, kan det medføre territorialadfærd, hvilket også vil kunne indvirke på væksten. Under alle omstændigheder skal belastningsgraden være så lav, at der kan opretholdes en koncentration af opløst ilt på mindst 60 % ASV uden beluftning. For regnbueørreders vedkommende har man ved en ringtest (2) påvist, at en belastningsgrad på 16 ørreder a 3-5 g i et volumen på 40 liter er acceptabel. Den anbefalede hyppighed for udskiftning af vandet under testen er 6 l pr. g fisk pr. dag.

1.8.2.3. *Fodring*

Fiskene skal fodres med et passende foder (tillæg 1) og tilstrækkeligt ofte til at frembringe en acceptabel tilvækst. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. For regnbueørreders vedkommende vil en fodertilførsel på 4 % af kropsvægten pr. dag som regel opfylde disse betingelser (2)(15)(16)(17). Den daglige foderration kan deles i to lige store portioner, som gives fiskene ved to daglige fodringer med mindst fem timers mellemrum. Rationen baseres på fiskenes samlede startvægt i hver enkelt testbeholder. Hvis fiskene vejes igen på testens 14. dag, genberegnes rationen ud fra denne vægt. Fiskene bør ikke fodres i 24 timer inden vejningen.

▼B

Foderrester og fækalmateriale skal hver dag fjernes fra testbeholderne ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af opsugning.

1.8.2.4. *Lys og temperatur*

Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (tillæg 1).

1.8.3. **Testkoncentrationer**

Normalt kræves, uanset testens design, fem koncentrationer af testkemikaliet (se 1.7.2). Forudgående kendskab til testkemikaliets toksicitet (f.eks. fra akut-testning og eller fra »range finding tests«) vil være nyttigt ved udvælgelsen af passende testkoncentrationer. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end fem koncentrationer. Den højeste testkoncentration må ikke overstige kemikaliets opløselighedsgrænse i vand.

Når der anvendes en opløselighedfremmer som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, må dens slutkoncentration ikke være højere end 0,1 ml/l og bør fortrinsvis være den samme i alle testbeholdere (se 1.6.3). Anvendelse af sådanne stoffer skal imidlertid så vidt muligt undgås.

1.8.4. **Kontrolprøver**

Antallet af fortyndingsvand-kontrolprøver afhænger af testens design (se 1.7-1.7.2). Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer, skal der desuden foretages det samme antal opløselighedsfremmer-kontrolprøver som fortyndingsvand-kontrolprøver.

1.8.5. **Hyppighed af analyser og målinger**

Under testen måles koncentrationerne af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum (se nedenfor).

Ved gennemstrørnningstest skal strømningshastighederne for fortyndingsmidlet og giftstofstamopløsningen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og de må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Hvis testkemikaliets koncentrationer forventes at ligge inden for ± 20 % af de nominelle værdier (dvs. inden for området fra 80 til 120 % — se 1.6.2 og 1.6.3), anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres ved testens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier (baseret på oplysninger om testkemikaliets stabilitet), vil det være nødvendigt at analysere samtlige testkoncentrationer, men efter samme retningslinjer.

Ved semistatiske (udskiftnings-) test, hvor testkemikaliets koncentration forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet og umiddelbart inden udskiftning, ved undersøgelsens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, skal samtlige testkoncentrationer analyseres efter samme retningslinjer som for mere stabile kemikalier.

▼B

Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan påvises, at testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier eller den målte startkoncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på de nominelle eller de målte værdier.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Det anbefales at centrifugere prøverne; men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.

Under testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i samtlige testbeholdere. Samlet hårdhedsgrad, alkalinitet og saltindhold (hvis dette er aktuelt) skal måles i kontrolbeholderne og i én beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis aktuelt) måles tre gange (ved testens begyndelse, midte og afslutning). Ved semistatiske test anbefales, at opløst ilt måles hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst én gang om ugen. pH skal måles ved begyndelsen og afslutningen af hver vandudskiftning ved statiske udskiftningstest og mindst én gang ugentligt ved gennemstrømningstest. Hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles én gang i hver test. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst én testbeholder.

1.8.6. **Observationer**

Vægt: Ved testens afslutning skal samtlige overlevende fisk vejes som vådvægt (duppes tørre), enten gruppevis pr. testbeholder eller enkeltvis. Vejning af fisk pr. testbeholder foretrækkes frem for individuel vejning, som kræver, at hver enkelt fisk skal mærkes. Hvis fiskene skal vejes enkeltvis med henblik på bestemmelse af enkeltfisk-specifik tilvækst, skal man vælge en mærkningsmåde, som undgår at stresse fiskene (der er egnede alternativer til frysemærkning, f.eks. anvendelse af tynd farvet fiskesnøre).

Fiskene skal i løbet af testperioden undersøges dagligt for eventuelle ydre abnormiteter (såsom blødninger eller misfarvning), og unormal adfærd registreres. Eventuelle mortaliteter skal registreres, og døde fisk skal fjernes hurtigst muligt. Døde fisk erstattes ikke. idet belastningsgraden og bestandtætheden er tilstrækkelige til. at indvirkninger på væksten som følge af ændringer i fiskeantallet pr. beholder undgås. Fodermængden skal imidlertid justeres.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Det anbefales, at en statistiker inddrages i både design og analyse af testen, eftersom denne testmetode tillader betydelige variationer i forsøgets design, som f.eks. antal testbeholdere, antal testkoncentrationer, antal fisk osv. I betragtning af valgmulighederne med hensyn til testens design vil der ikke blive givet nogen vejledning i statistiske procedurer her.

▼B

Tilvæksten bør ikke beregnes for testbeholdere, hvor mortaliteten overstiger 10 %. Mortalitetsprocenten skal imidlertid anføres for samtlige testkoncentrationers vedkommende.

Uanset hvilken metode, der anvendes til dataanalysen, er det centrale koncept den specifikke tilvækst r mellem tidspunktet t_1 og tidspunktet t_2. Denne kan defineres på flere måder afhængigt af, hvorvidt fiskene er mærket individuelt, eller hvorvidt der ønskes et beholdergennemsnit.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

hvor:

r_1 = enkeltfisk-specifik tilvækst

r_2 = beholdergennemsnitsspecifik tilvækst

r_3 = »pseudo«-specifik tilvækst

w_1, w_2 = en bestemt fisks vægt på henholdsvis tidspunkt t_1 og t_2

$\log_e w_1$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens begyndelse

$\log_e w_2$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens afslutning

$\log_e W_1$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_1 for fiskene i beholderen ved testperiodens begyndelse

$\log_e W_2$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_2 for fiskene i beholderen ved testperiodens afslutning

t_1, t_2 = tidspunktet (dag) for testperiodens begyndelse og afslutning

r_1, r_2, r_3 kan udregnes for tidsrummet mellem 0 og 28 dage og, hvor det er aktuelt (dvs. når der er foretaget måling på dag 14), for tidsrummene mellem 0 og 14 samt mellem 14 og 28 dage.

2.1.1. **Resultatanalyse ved regression (koncentrationsrespons-model)**

Denne analysemetode fører frem til en passende matematisk sammenhæng mellem den specifikke tilvækst og koncentrationen og gør det således mulig: at beregne »EC_x«, dvs. en hvilken som helst ønsket EC-værdi. Ved anvendelse af denne metode er udregningen af r for enkeltfisk (r_1) ikke nødvendig, og analysen kan i stedet baseres på r-beholdergennemsnitsværdien (r_2). Sidstnævnte metode foretrækkes. Den er også mest hensigtsmæssig, hvor den mindste fiskeart bruges.

Den beholdergennemsnitsspecifikke tilvækst (r_2) bør plottes grafisk som funktion af koncentrationen, for at forholdet mellem koncentration og respons kan undersøges.

▼B

Når forholdet mellem r_2 og koncentration skal vises, bør man vælge en passende model, og valget skal begrundes på hensigtsmæssig vis.

Hvis der ikke er lige mange overlevende fisk i de enkelte beholdere, bør modeltilpasningsmetoden vægtes, hvad enten denne er simpel eller nonlineær, for at tage højde for grupper af uens størrelse.

Modeltilpasningsmetoden skal give mulighed for, at en beregning af f.eks. EC_{20} og dennes fordeling (enten standardfejl eller konfidensinterval) kan udledes. Grafen for den tilpassede model bør vises i forhold til dataene, så modeltilpasningens tilstrækkelighed tydeligt fremgår (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analyse af resultaterne for beregningen af LOEC**

Hvis testen har omfattet replikation af samtlige beholdere ved samtlige koncentrationsniveauer, vil beregningen af LOEC kunne baseres på en variansanalyse (ANOVA) af den beholdergennemsnitsspecifikke tilvækst (se 2.1), efterfulgt af en egnet metode (f.eks. Dunnetts eller Williams' test (12)(13)(14){21)) til sammenligning af det gennemsnitlige r for hver enkelt koncentration med det gennemsnitlige r for kontrolgrupperne, for at identificere den laveste koncentration, ved hvilken denne forskel er signifikant på et sandsynlighedsniveau på 0,05. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normal fordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA.

Hvis testen ikke har omfattet replikation af beholdere ved hver enkelt koncentration, vil en ANOVA, der baseres på beholdere, være ikke-udslagsgivende eller umulig. I denne situation vil det være et acceptabelt kompromis at basere ANOVA på den »pseudo«-specifikke tilvækst r_3 for enkeltfisk.

Det gennemsnitlige r_3 for hver enkelt testkoncentration kan så sammenlignes med det gennemsnitlige r_3 for kontrolgrupperne. Derpå kan LOEC identificeres som tidligere beskrevet. Man må forstå, at denne metode hverken tager hensyn til eller yder beskyttelse mod variabilitet mellem beholdere, ud over hvad der kan tilskrives variabiliteten mellem enkeltfisk. Erfaringerne har imidlertid vist (8), at variabilitet mellem beholdere har været meget lille sammenlignet med variabiliteten inden for de enkelte beholdere (dvs. mellem fisk). Hvis analysen ikke omfatter enkeltfisk, skal det med begrundelse anføres, hvilken metode der er benyttet til identifikation af ekstreme værdier.

2.2. TOLKNING AF RESULTATERNE

Resultaterne skal tolkes med forsigtighed, hvor den målte koncentration af giftstof i testopløsningeme ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, eller ved semistatiske test, hvor testkemikaliets koncentration i den nyligt fremstillede opløsning falder inden udskiftningen.

2.3. TESTRAPPORTEN

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

▼B

2.3.1. **Testkemikaliet:**

— fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og eventuelt analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet.

2.3.2. **Fiskeart(er), der indgår i testen:**

— videnskabeligt navn, og eventuelt

— stamme, størrelse, leverandør, evt. forudgående behandling osv.

2.3.3. **Testbetingelser:**

— anvendt testprocedure (f.eks. semistatisk/udskiftning. gennemstrømning, belastning, bestandtæthed osv.)

— testdesign (f.eks. antal testbeholdere, testkoncentrationer og replikater, antal fisk pr. beholder)

— metode til fremstilling af stamopløsmnger samt udskiftningshyppighed (eventuelt anvendt opløselighedsfremmer og dennes koncentration skal anføres)

— de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis målt) og samtlige andre udførte målinger

— vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

2.3.4. **Resultater:**

— dokumentation for, at kontrolgrupperne opfylder validitetskritenet for overlevelse, samt data vedrørende mortaliteten ved de enkelte testkoncentrationer

— anvendte statistiske analyseteknikker, statistikker baseret på replikater eller fisk, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker

— data i tabelform vedrørende fiskenes individuelle og gennemsnitlige vægt på dag 0, 14 (hvis aktuelt) og 28, værdier for beholdergennemsnits- eller pseudospecifik tilvækst (alt efter hvad der er aktuelt) i tidsrum met fra dag 0 til 28 eller eventuelt 0-14 og 14-28

— resultater af den statistiske analyse (dvs. regressionsanalyse eller ANOVA), fortrinsvis i tabelform og grafisk form, og LOEC ($p = 0,05$) og NOEC eller EC_x, eventuelt med standardfejl, alt efter hvad der er aktuelt

▼B

— forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

3. HENVISNINGER

(1) Solbe, J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Ashley, S., Mallett, M.J. and Grandy, N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland, N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Nagel, R., Bresh, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Market, M., Munk, R., Scholz, N. and Höfte, B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes)*.Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287-297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *(Oryzias latipes)*. Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan, C.E. and Rogers, J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R.C. Bahner and D.J. Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(10) Cox, D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack, S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate offish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

▼B

(14) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville, N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

Tillæg 1

FISKEARTER ANBEFALET TIL TESTNING, OG EGNEDE TESTBETINGELSER

Arter	Anbefalet område for test-temperatur (°C)	Lysperiode (timer)	Anbefalet område for fiskenes start-vægt (g)	Påkrævet målings-nøjagtighed	Belastningsgrad (g/l)	Bestandtæthed {pr. liter)	Foder	Testens varighed (dage)
Anbefalet art:								
Oncorhynchuss mykiss Regnbueørred	12,5 - 16,0	12-16	1-5	Til nærmeste 100 mg	1,2 - 2,0	4	Mærkevaretørfoder til laksefi-skeyngel	≥ 28
Andre veldokumenterede arter:								
Danio rerio Zebrafisk	21-25	12-16	0,050 - 0,100	Til nærmeste 1 mg	0,2 - 1,0	5-10	Levende foder (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Riskarpe (Medaka)	21-25	12-16	0,050 - 0,100	Til nærmeste 1 mg	0,2 - 1,0	5-20	Levende foder (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

Tillæg 2

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Stof	Koncentrationer
Partikler	< 20 mg/l
Total organisk kulstof	< 2 mg/l
Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Total phosphorholdige organiske pesticider	< 50 ng/l
Total chlorholdige organiske pesticider plus polychlorerede biphenyler	< 50 ng/1
Total organisk chlor	< 25 ng/1

▼B

Tillæg 3

Logaritmiske rækker af koncentrationer, der er egnede til toksicitetstest (9)

Søjle (antal koncentrationer mellem 100 og 10, eller mellem 10 og 1) (1)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(1) En række bestående af fem (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en kolonne. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i kolonne (x) findes i kolonne (2x + 1), De anførte værdier kan repræsentere koncentrationer udtrykt i procent pr. volumen eller vægt (mg/l eller µg/l). Værdierne kan multipliceres eller divideres med en hvilken som helst potens af 10, alt efter hvad der er aktuelt. Kolonne 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

▼B

C.15. **FISK, KORTTIDSTOKSICITETSTEST UDFØRT PÅ FISKEEMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL**

1. **METODE**

Denne korttids toksicitetstestmetode svarer til OECD TG 212 (1998).

1.1. INDLEDNING

Denne korttidstoksicitetstest udført på fiskeembryoner og blommesækyngel er en korttidstest, i hvilken det nybefrugtede æg er udsat for giftstof indtil slutningen af blommesækstadiet. Der skal ikke fodres i denne test, og testen skal således afsluttes, medens yngelen stadig får sin næring fra blommesækken.

Testens formål er at finde letale og til en vis grad subletale virkninger af kemikalier på specielle stadier og arter. Denne test kunne skaffe nyttig viden, idet den kunne a) danne en bro mellem letale og subletale test, b) blive anvendt som en screeningtest enten for en test på alle tidlige livsstadier eller for en test for kronisk toksicitet og c) bruges til at teste arter, hvor dyrkningsteknikkerne ikke er tilstrækkeligt gode til at dække overgangsperioden mellem endogen og eksogen fodring.

Man bør erindre sig, at kun test, der omfatter alle stadier i fisks livscyklus, kan påregnes at give en præcis vurdering af kemikaliers kroniske toksicitet over for fisk, og at enhver begrænsning i påvirkning inden for livsstadierne kan reducere følsomheden og således undervurdere den kroniske toksicitet. Man må derfor forvente, at testen på fiske-embryoner og blommesækyngel har mindre følsomhed end en test, der omfatter alle tidlige livsstadier, specielt med hensyn til meget lipofile kemikalier (log P_{ow} > 4) og til kemikalier med en særlig type toksisk virkning. Imidlertid må man forvente mindre forskelle i følsomhed mellem de to test med hensyn til kemikalier, der har en ikke-specifik, narkotisk virkningsmåde (1).

Forud for offentliggørelsen af denne test udført på fiskeembryoner og blommesækyngel havde man størst erfaring med anvendelsen af ferskvandsfisken Danio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — almindeligt navn: zebrafisk). Mere detaljerede retningslinjer for resultater med denne art er derfor anført i tillæg 1. Dette udelukker ikke brugen af andre arter, for hvilke der ligeledes foreligger erfaringer (tabel 1A og 1B).

1.2. DEFINITIONER

Laveste koncentration med statistisk sikkert observeret effekt (LOEC) er den laveste kemikaliekoncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$), sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal forårsage skadelige virkninger på samme eller højere niveau end observeret ved LOEC.

Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC) er testkoncentrationen lige under LOEC.

▼B

1.3. TESTPRINCIPPET

Fiskeembryoner og blommesækyngel udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand. Protokollen tillader valg mellem en semistatisk og en gennemstrømningsprocedure. Valget afhænger af testkemikaliets natur. Testen begynder med, at man anbringer befrugtede æg i forsøgsbeholderne, og den slutter, lige før blommesækken er blevet fuldstændig resorberet af en hvilken som helst af fiskelarverne i en hvilken som helst forsøgsbeholder, eller før dødsfald indtræffer i kontrolbeholderne på grund af sult. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at fastslå den laveste koncentration med statistisk observeret effekt og ud derfra den koncentration, der ikke giver nogen statistisk sikker virkning. Alternativt kan man analysere resultaterne ved hjælp af en regressionsmodel for at finde frem til den koncentration, der ville give en bestemt procentisk effekt (dvs. LC/EC_x, hvor x er en defineret procentisk virkning).

1.4. KENDSKAB TIL TESTKEMIKALIET

Resultater fra en akut toksicitetstest (se metode C.1), fortrinsvis udført på arten valgt til denne test. bør foreligge. De kan være nyttige med henblik på valg af passende område af testkoncentrationer i testen udført på tidlige livsstadier. Vandopløselighed, (inklusive opløseligheden i testvandet) og testkemikaliets damptryk bør kendes. En pålidelig analyse til kvantificering af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og publiceret »accuracy« og nederste målegrænse bør foreligge.

Informationer om testkemikaliet, nyttige for testbetingelserne, inkluderer strukturformel, renhedsgrad, lysstabilitet, stabilitet under testens betingelser, pKa, P_{ow} og resultater fra en test for spontan biologisk nedbrydelighed (se metode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

En tests validitet forudsætter:

— den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og, hvor relevant, i kar med rent opløsningsmiddel skal være større end eller lig med grænserne definerede i tillæg 2 og 3

— koncentrationen af opløst ilt skal være mellem 60 og 100 % af værdien for mætning med luft (ASV) i hele testperioden

— vandtemperaturen må ikke variere mere end ± 1,5 °C imellem forsøgsbeholderne eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen, og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art. (tillæg 2 og 3).

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forsøgsbeholdeme**

Enhver type glas eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Forsøgsbeholdernes dimensioner skal være store nok til at klare kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) Det anbefales at anbringe forsøgsbeholdeme randomiseret. Et randomiseret design med grupper af forsøgsbeholdere, hvor samme behandling forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system, når der er systematiske virkninger i laboratoriet, som kan kontrolleres ved gruppering. I den påfølgende dataanalyse bør der tages hensyn til en eventuel gruppering. Forsøgsbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

1.6.2. **Valg af fiskeart**

Anbefalede fiskearter ses i tabel 1A. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre arter (eksempler ses i tabel 1B), men testproceduren må muligvis ændres for at opnå passende testbetingelser. Brug af andre arter og undersøgelsesmetode skal i så fald begrundes.

1.6.3. **Opbevaring af fisk til yngel**

Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210 ([1]) og i henvisning (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Håndtering af embryoner og fiskelarver**

Embryoner og fiskelarver kan, mens de udsættes for testkemikaliet, opholde sig i mindre kar med netvægge eller i rør med net for enderne med disse mindre kar placerede i forsøgskarret, således at testopløsningen kan flyde igennem. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karrene op og ned, dog altid med organismerne under overfladen; man kan også anvende et system med gennemskylning ved hjælp af overtryk. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning. Pasteurpipetter er anvendelige til at flytte embryoner og larver i de semistatiske test i forbindelse med den daglige totale udskiftning af testopløsningen (se 1.6.6).

I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i forøgskarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes ([2]), idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne fisk fra beholdere (fra en sådan advarsel kan nok undtages mindre sarte arter, som f.eks. karpen). Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde. Ved brug af den semistatiske teknik kan man anvende bægerglas eller lave beholdere, eventuelt, hvis nødvendigt, forsynet med et netværk løftet en smule op over bægerglassets bund. Hvis beholderne er store nok til at opfylde kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) kan overflytning af embryoner eller larver eventuelt undgås.

([1]) OECD. Paris, 1992, Test Guideline 210, »Fish, Early-life Stage Toxicity Test«.

([2]) Ifølge resultaterne af sådanne ringtest og en teknisk berigtigelse af ISO 6341 ligger EC_{50} — 24 h for kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) mellem 0,6 mg/l og 1,7 mg/l.

▼B

1.6.5. **Vand**

Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 4 og i hvilket fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse mindst lige så god som beskrevet i tillæg 2 og 3. Kvaliteten må ikke ændre sig i løbet af testperioden. pH skal holde sig inden for ± 0,5 pH-enheder. For at sikre, at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne kompleks med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), væsentlige kationer og anioner (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og So_4), pesticider (f.eks. totale organofosfor- og totale organochlorinopesticider), totalt organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer bør f.eks. foretages hver tredje måned, hvis man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned).

1.6.6. **Testopløsning**

Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved opblanding eller oprystning af testkemikaliet i opløsningsvandet ad mekanisk vej (f.eks. omrøring og ultralydbehandling). Saturation colums (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Videst muligt bør brugen af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler undgås; imidlertid kan den type stoffer være nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Som eksempler på anvendelige opløsningsmidler kan nævnes acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethyleneglycol. Som eksempel på en anvendelige dispergenser kan nævnes Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Stor omhu bør udvises, når man anvender stoffer, der er let biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller let fordampelige, da de kan medføre problemer med bakterielle belægninger i gennemstrømningstestene, Når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig uheldig virkning på de tidlige livsstadier, som det kan kontrolleres i en test med kun opløsningsmiddel. Alle anstrengelser bør imidlertid gøres for at undgå brugen af sådanne stoffer.

I den semistatiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen; enten i) fremstilles nye testopløsninger i rene forsøgsbeholdere og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt inde i små volumina af den gamle opløsning til det nye forsøgsbeholdere, idet man undgår at udsætte dem for luft, eller ii) testorganismerne bibeholdes i forsøgsbeholderne, medens mindst tre fjerdedele af testvandet udskiftes. Hvor hyppigt det skal gøres, afhænger af testkemikaliets stabilitet, men en daglig udskiftning anbefales. Hvis tidligere stabilitetsforsøg (se 1.4) har vist, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. falder uden for 80-120 % af de nominelle grænser eller under 80 % af den målte begyndelseskoncentration) i løbet af udskiftningsperioden, bør man overveje at anvende en test med gennemstrømning. Under alle omstændigheder skal man være omhyggelig med ikke at stresse larverne, når vandet fornyes.

▼B

Til gennemstrømningstestene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med test-kemikaliet (f.eks. peristaltpumper, *proportional diluter, saturator system*) for at yde en række forskellige koncentrationer til forsøgsbeholderne. Med mellemrum, fortrinsvis dagligt, kontrolleres flow-hastigheden fra stamopløsningen og vandfortyndingen, og de bør ikke variere mere end 10 % i testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumenet af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (2).

1.7. FREMGANGSMÅDE

Nyttig viden om, hvad testen med fiskeembryoner og blommesækyngel kan præstere, kan findes i litteraturen, og eksempler herpå kan findes i henvisning (7)(8)(9).

1.7.1. **Omstændigheder ved belastningen**

1.7.1.1. *Varighed*

Helst skal testen begynde mindre end 30 minutter efter befrugtningen. Embryonerne sænkes ned i testopløsningen før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig. og i hvert fald for begyndelsen af gastrula-stadiet. Med æg, der leveres udefra, kar. man ikke altid begynde testen umiddelbart efter befrugtningen. Da testens følsomhed kan blive alvorligt påvirket af en forsinket teststart, bør testen påbegyndes senest otte timer efter befrugtningen. Da fiskelarverne ikke fodres i testperioden, afsluttes testen, lige før blommesækken er resorberet fuldstændigt i en hvilken som helst larve i en hvilken som helst forsøgsbeholder, og før sultedøden indtræffer i kontrollerne. Varigheden afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i tillæg 2 og 3.

1.7.1.2. *Belastning*

Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene skal fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger og mindst 30 befrugtede æg, ligeligt fordelt, til mindst tre replikate testbeholdere pr. koncentration af testkemikalium (så vidt gørligt, det kan være vanskeligt med nogle arter at opnå lige store mængder). Belastningsraten (biomasse per volumen af testopløsningen) bør være så lav, så den opløste iltkoncentration på mindst 60 % ASV kan vedligeholdes uden beluftning. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsrate på ikke over 0,5 g/l per døgn og ikke over 5 g/l opløsning på noget tidspunkt (2).

1.7.1.3. *Lys og temperatur*

Perioderne med lys og testvandets temperatur skal passe til den valgte art (tillæg 2 og 3). For at holde temperaturen konstant kan det være nødvendigt med endnu et forsøgskar.

▼B

1.7.2. **Testkoncentrationer**

Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikaliet med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Kurven fra de akutte toksicitetstest, som knytter LC_{50} til testperioden, bør tages i betragtning, når man vælger området for testkoncentrationerne. Brug af færre end fem koncentrationer, for eksempel i en grænsetest, og et snævrere interval mellem koncentrationerne kan være rimeligt under nogle omstændigheder. Begrundelse skal anføres, hvis færre end fem koncentrationer anvendes. Det er ikke nødvendigt at teste koncentrationer højere end svarende til 96 timer LC_{50} eller 100 mg/l, afhængigt af hvilken af disse, der er lavest. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger deres opløselighed i testvandet.

Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælp ved fremstillingen af testopløsninger (se 1.6,6), bør dets endelige koncentration i forsøgsbeholderen ikke overstige 0,1 ml/l og den skal være den samme i alle forsøgsbeholdere.

1.7.3. **Kontroller**

Sammen med testserien skal udføres en kontrol af fortyndingsvandet (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt) og ligeledes, hvis relevant, en kontrol, som indeholder opløsningsmiddel (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt).

1.7.4. **Hyppighed af analyser og målinger**

I testperioden måles koncentrationen af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af testkemikaliet forventes at holdes inden for 20 % af det nominelle (dvs. inden for 80-120 %; se 1.4 og 1.6.6), anbefales det, som et minimum, at den højeste og laveste testkoncentration måles, når den er frisk fremstillet og umiddelbart før udskiftning ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden (dvs. analyserne skal udføres på en prøve fra den samme opløsning, når den er frisk fremstillet og ved dens anvendelse ved udskiftning).

I test, hvor koncentrationen af testkemikaliet ikke forventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle (baseret på kemikaliets stabilitetsdata), er det nødvendig; at analysere alle testkoncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning, efter samme system (dvs. ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over testperioden). Målingen af koncentrationen af testkemikaliet før udskiftning er kun nødvendigt på en af beholderne i replikate bestemmelser for hver testkoncentration. Målingerne skal foretages mindst hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan vises, at testkemikaliets koncentration testen igennem i tilstrækkelig grad har været holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte begyndelsesværdier.

Hvad angår gennemstrømningstest er det passende med et prøvetagningsregime som for de semistatiske test (men måling af udskiftede opløsninger er ikke mulig i disse tilfælde). Hvis imidlertid testen varer mere end en uge. er det tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger i den første uge (f.eks. til tre) for at sikre, at test-koncentrationcme holder sig stabile.

▼B

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere (f.eks. med et filter med 0,45 μm porestørrelse). Da imidlertid hverken centrifugering eller filtrering altid synes at skille den biotilgængelige fra den ikke-biotilgængelige del af testkemikaliet, behøver prøver ikke at gennemgå disse behandlinger.

1 løbet af testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i alle testbeholderne. Hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis relevant) måles tre gange (i begyndelsen, midt i og ved afslutningen af testen). I de semistatiske test anbefales det at måle ilt hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst en gang om ugen. pH skal måles før og efter vandudskiftning i de semistatiske test og mindst en gang ugentlig i gennemstrømningstestene. I hver test skal hårdhedsgraden måles en gang. Temperaturen skal måles daglig og helst være monitoreret kontinuerligt i mindst en test-beholder.

1.7.5. **Observationer**

1.7.5.1. *Fosterets udviklingstrin*

Fosterstadiet (dvs. gastrula-stadiet) bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelse, hvor fosteret udsættes for testkemikaliet. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og godkendes. I litteraturen kan man finde beskrivelser og illustrationer af fosterstadier (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. *Udklækning og overlevelse*

Udklækning og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. I begyndelsen af testen kan det være ønskeligt at foretage hyppigere observationer (f.eks. hver halve time i løbet af de første tre timer), da overlevelsestid i nogle tilfælde kan være mere relevant end antallet af dødsfald alene (f.eks. når der er akutte toksiske virkninger). Døde embryoner og larver skal fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke bliver ramt eller fysisk beskadigede, da de er meget sarte og følsomme. Kriterier for død varierer efter stadium:

— **for æg**: særligt i de tidlige stadier et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed

— **for embryoner:** manglende bevægelighed og/eller hjerteslag og/eller uklar misfarvning i arter, hvor embryonerne almindeligvis er gennemskinnelige

— **for larver:** manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

▼B

1.7.5.3. *Abnormt udseende*

Antallet af larver, der udviser abnorm kropsform og/eller pigmentering, og tidspunkt for resorption af blommesækken skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme embryoner og larver optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Abnorme dyr skal kun fjernes fra beholderne, når de er døde.

1.7.5.4. *Abnorm opførsel*

Abnorm opførsel, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning og atypisk ubevægelighed, skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed. Disse virkninger kan, når de opdages, selvom de er vanskelige at kvantitere, hjælpe med til at tolke mortalitetsdata, dvs. skaffe viden om, hvorledes kemikaliets toksiske virkning udspiller sig.

1.7.5.5. *Længde*

Ved testens afslutning anbefales måling af individernes forskellige længde: Standard, fork eller totallængden kan anvendes. Hvis imidlertid der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, anvendes standardlængden. Almindeligvis vil i en vellykket testvariationskoefficient for længden i replikate bestemmelser ligge på $\leq$ 20 %.

1.7.5.6. *Vægt*

Ved testens afslutning kan foretages vejning af dyrene: Tørvægt (24 timer ved 60 ^{o}C) bør foretrækkes frem for vådvægt (aftørret). Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten på vægten i replikate bestemmelser ligge på $\leq$ 20 %.

Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan gøres til genstand for statistisk analyse:

— kumulativ mortalitet

— antal sunde larver ved afslutning af testen

— begyndelses- og sluttidspunkt for klækning (dvs. 90 % klækning i hvert replikat)

— det daglige antal larver, der klækkes

— længde (og vægt) af overlevende dyr ved testens afslutning

— antal larver, der er deforme eller har abnormt udseende

— antal larver, der opfører sig abnormt.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Det anbefales, at en statistiker involveres både i design og i analyse af testen, eftersom metoden tillader betragtelige variationer i tilrettelæggelse af eksperimentet, som f.eks. antallet af forsøgsbeholdere, antal testkoncentrationer, begyndelsesantal af befrugtede æg og de målte parametre. I betragtning af valgmulighederne i testdesign, vil her ikke blive vejledt i statistiske procedurer.

Hvis LOEC/NOECs skal beregnes, er det, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse (ANOVA) eller at anvende kontingenstabeller. Dunnets metode kan være nyttig til at foretage multiple sammenligninger mellem resultater fra individuelle koncentrationer og kontrollerne (12)(13). Andre nyttige eksempler kan også findes (14)(15). Størrelsen af den målbare effekt ved anvendelse af ANOVA eller andre procedurer (dvs. styrken af testen) bør udregnes og angives. Det bør bemærkes, at ikke alle observationer listet i 1.7.5.6 kan analyseres ved hjælp af ANOVA. F.eks. bør kumuleret død og antallet af sunde larver analyseres ved hjælp af probitmetoder.

Hvis LC/ECx'er skal beregnes, bør (en) passende kurve(r), f.eks. den logistiske kurve, fittes til de ønskede data ved hjælp af en statistisk metode som f.eks. mindste kvadraters metode eller ikke-lineære mindste kvadraters metode. Kurverne bør parametriseres, så den ønskede LC/ECx og dens standard error kan udregnes direkte. Dette vil gøre beregningen af sikkerhedsgrænserne for LC/ECx meget nemmere. Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, bør tosidede 95 %-sikkerhedsgrænser angives. Fitningsmetoden skulle helst give mulighed for beregning af en signifikans for mangel på fit. Grafiske metoder for fitning af kurver kan anvendes. Regressionsanalyse kan anvendes på alle observationer listet i 1.7.5.6.

2.2. TOLKNING AF RESULTATER

Hvor den målte koncentration af giftstoffet i testopløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtighed. Tolkning af resultater, hvor koncentrationerne ligger over stoffets vandopløselighed. skal også gøres med forsigtighed.

2.3. TESTRAPPORTEN

Testrapporten bør indeholde følgende information:

2.3.1. **Test-kemikaliet:**

— dets fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identitets-data, heri renhedsgrad og, hvor nødvendigt, den analytiske metode til kvantificering af stoffet.

▼B

2.3.2. **Arten, anvendt i testen:**

— dens videnskabelige navn, herkomst, antal forældrefisk (dvs. hvor mange hundyr blev brugt for at fremskaffe det ønskede antal æg til testen), kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

2.3.3. **Forsøgsbetingelser:**

— anvendt fremgangsmåde (f.eks.. semistatisk eller gennemstrømsforsøg, tidsforløb fra befrugtning til begyndelsen af testen, belastning osv.)

— lysperiode(r)

— testdesign (f.eks. antal forsøgsbeholdere og replikater, antal embryoner pr. replikat

— fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, skal dets koncentration anføres)

— den nominelle testkoncentration, de målte værdier, gennemsnit og standarddeviationer for forsøgskarrene og metoden, hvorved de er opnået, og, hvis testkemikaliet er opløseligt i vand i koncentrationer, der ligger under de undersøgte, skal der skaffes bevis for, at målingerne refererer til testkemikaliet i opløsning

— karakteristik af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof, opslæmmede substanser, saltindhold i testmediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt

— vandkvalitet i forsøgskarrene: pH. hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt.

2.3.4. **Resultater:**

— resultater fra ethvert præliminært forsøg med testkemikaliets stabilitet

— bevis på, at testdyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard (tillæg 2 og 3)

— data vedrørende mortalitet/overlevelse på embryon- og larvestadierne og den totale mortalitet/overlevelse

— antal dage til klækningen og antal klækninger

— data vedrørende længde (og vægt)

— morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer

— abnorm opførsel beskrives, hvis den forekommer

— statistisk analyse og behandling af data

— vedrørende test, hvor ANOVA er anvendt, anføres laveste observerede effekt-koncentration (LOEC) ved p = 0,05 og den koncentration, der var uden effekt (NOEC) ved hver måling, inklusive de statistiske procedurer og en angivelse af, hvilken størrelse effekt der kunne påvises

▼B

— i forbindelse med test, hvor regressionsteknik er anvendt, anføres LC/ECx og sikkerhedsgrænser og en graf med den fitningsmetode, der blev brugt til beregningen

— redegørelse for enhver afvigelse fra denne testmetode.

3. **HENVISNINGER**

(1) Kristensen P, (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn, J.L. and Schoettger, R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs, W.A. and Jones, B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale, H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault, R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Bmchydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave, G., Damgaard, B., Grande, M., Martelin, J.E., Rosander, B. and Viktor, T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge, J.W., Black, J.A. and Westerman, A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen, C.J., Espeldoom, A. and Mol, F, (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *{Salmo gairdneri),* J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen, R.V. and W.R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen, R.V. and W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen, C.J., Adema, D.M.M. and Henries, J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave, G. and Xiu, R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21. pp. 126-134.

(18) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 25 2: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F. and Roubaud, P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve, G.M, Cooney, J.D., Mclntyre, D.O., Poccocic, T.L, Reichenbach, N.G., Dean, J.H. and Marcus, M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow, P, (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon, E. K. (198 5). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter, J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, in: W.S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tabel 1A

Fiskearter, som er anbefalet til testning

Ferskvand
Oncorhynchus mykiss Regnbueørred (9) (16)
Danio rerio Zebrafisk (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Alm. karpe (8) (19)
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8) (22)

▼B

Tabel 1B

Eksempler på andre veldokumenterede arter, som også har været anvendt

Ferskvand	Saltvand
Carassius auralus Guldfisk (S)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Bluegill (8)	*Clupea harengus* Sild (24) (25)
	Gadus morhua Torsk (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23) (24) (25)

▼B

Tillæg 1

VEJLEDNING I UDFØRELSE AF TOKSICITETSTEST PÅ EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL FRA ZEBRAFISK (BRACHYDANIO RERIO)

INDLEDNING

Zebrafisken kommer oprindeligt fra Coromandelkysten i Indien, hvor den opholder sig i hurtigtrindende strømme. Den er en almindelig akvariefisk af karpefamilien, og oplysninger om fremgangsmåde i behandlingen og dyrkningen af den kan findes i standardreferenceværker om tropiske fisk. Dens biologi og anvendelse i fiskeriundersøgelser findes i et review af Laale (1).

Fisken bliver sjældent længere end 45 cm. Kroppen er cylindrisk med 7-9 mørkeblå horisontale striber. Disse striber løber ud i de caudale og anale finner. Ryggen er olivengrøn. Hannerne er slankere end hunnerne. Hunnerne er mere sølvskinnende, og abdomen er udspilet, særligt lige før æglægning.

Voksne fisk tåler store svingninger i temperatur, pH og vandhårdhed. For at sikre sig sunde fisk, som lægger æg af god kvalitet, bør man sørge for optimale betingelser.

Under æglægningen forfølger hannen hunnen og skubber til hende med snuden, og når æggene er kommet ud, bliver de befrugtede. Æggene, som er gennemsigtige og ikke-klæbende, synker til bunds, hvor de kan ædes af forældrene. Lys har indflydelse på æglægningen. Hvis lyset om morgenen er tilstrækkeligt, vil fiskene almindeligvis lægge æg i de tidlige timer efter morgengry.

En hun kan producere adskillige hundrede af æg ad gangen med ugers mellemrum.

FORÆLDREFISK, REPRODUKTION OG TIDLIGE LIVSSTADIER

Udvælg et passende antal sunde fisk og hold dem i passende vand (f.eks. tillæg 4) i mindst to uger før den ønskede æglægning. Fiskene bør formere sig mindst en gang, før de producerer den samling æg, der skal bruges i testen. Fisketætheden bør ikke overstige 1 gram fisk pr liter. Regelmæssig fornyelse af vand eller anvendelse af rensningsanlæg kan tillade større fisketæthed. Temperaturen i tankene bør holdes på 25 ± 2 °C. Fiskene bør fodres med en varieret kost f.eks. af passende kommercielt tørfoder, levende nyklækkede Arthemia, chironomider, dafnier, hvide orm (Enchytraeider).

Nedenfor er skitseret to fremgangsmåder, der i praksis har ydet en tilstrækkelig mængde sunde, befrugtede æg til brug i en test:

i) 8 hunner og 16 hanner placeres i et akvarium med 50 liter fortyndingsvand, skærmet mod direkte lys og holdt så uforstyrret som muligt i mindst 48 timer. En bakke til ægopsamling anbringes i bunden af akvariet om eftermiddagen, dagen før testen begynder. Ægopsamlingsbakken består af en ramme (plexiglas eller andet passende materiale), 5-7 cm høj med et groft 2-5 mm net fæstnet til kanten og et 10-30 μm fint net på bunden. Et passende antal »æglægnings-træer«, lavet af optrevlet nylonreb, sættes fast på det grove net. Fiskene efterlades i mørke i 12 timer, hvorefter et svagt lys tændes, hvilket vil føre til æglægning. To til fire timer efter æglægningen fjernes bakken, og æggene samles. Bakken vil hindre fiskene i at æde æggene og letter samtidig indsamlingen af æggene. Disse fisk skal have lagt æg mindst en gang før den, hvorfra æggene anvendes til testning.

▼B

ii) Fra 5 til 10 han- og hunfisk holdes adskilt hver for sig i mindst to uger før den planlagte æglægning. Efter 5-10 dage vil hunnernes abdomen være udspilet og deres papillae genitales synlige. Sådanne har hanfisk ikke. Æglægning foregår i et æglægningsakvarium, forsynet med en falsk netværksbund (som ovenfor). Akvariet fyldes med fortyndingsvand, så der står 5-10 cm vand over nettet. En hun og to hanner anbringes i akvariet dagen før den planlagte æglægning. Vandtemperaturen øges gradvist til en grad over akklimatisationstemperaturen. Lyset slukkes, og akvariet holdes så uforstyrret som muligt. Næste morgen tændes et svagt lys, som får æglægningen til at gå i gang. 2-4 timer efter fjernes fiskene, og æggene indsamles. Hvis man har brug for flere æg, end en enkelt hun kan levere, opstilles flere akvarier parallelt. Ved at notere sig formeringens størrelse og kvalitet for hver hun før testen, kan man udvælge sig de bedste hunner til formering.

Æggene flyttes til forsøgsakvariet ved hjælp af glasrør med en indre diameter ikke mindre end 4 mm og forsynede med en sugeballon. Mængden af vand, der flyttes med æggene ved flytningen, skal være så ringe som muligt. Æggene er tungere end vand og synker selv ud af røret. Omhu skal udvises, så æg (og larver) ikke kommer i kontakt med luften. Ved hjælp af mikroskopiske undersøgelser af prøver fra æggene sikrer man sig, at de første stadier ikke udviser irregulære former. Det er ikke tilladt at desinficere æggene.

Mortaliteten blandt æggene er størst inden for de første 24 timer efter befrugtningen. Ofte ses en mortalitet på 5-40 %. Æg degenerer på grund af befrugtning, der ikke lykkes, eller udviklingsfejl. Æggenes kvalitet synes at bero på hunfisken, da nogle hunner hele tiden producerer gode ægkvaliteter, mens andre aldrig gør det. Udviklingshastigheden og klækningshastigheden varierer fra et kuld til et andet. Hvor befrugtningen lykkes, og hvor blommesækynglen klarer sig godt, overlever normalt over 90 %. Ved 25 ^{o}C klækkes æggene 3-5 dage efter befrugtningen, og blommesækken resorberes ca. 13 dage efter befrugtningen.

Fosterudviklingen er vel beskrevet af Hisaoka og Battle (2). På grund af æggenes og de udklækkede larvers gennemsigtighed kan fiskenes udvikling følges, og tilstedeværelsen af malformationer observeres. Omkring 4 timer efter æglægningen kan de ikke-befrugtede æg skelnes fra de befrugtede (3). Til denne undersøgelse bliver æg og larver anbragt i små undersøgelseskar og set på under mikroskop.

Testbetingelserne, som vedrører de tidlige livsstadier, findes i tillæg 2. De optimale værdier for pH og vandhårdhed er 7,8 og 250 mg $CaCO_3$/l, respektive.

BEREGNINGER OG STATISTIK

Der foreslås beregninger i to tempi. Først foretages statistisk analyse af data vedrørende mortalitet, unormal udvikling og klækningstidspunkt. Derefter evalueres kropslængden statistisk for de koncentrationer, hvor ingen af ovennævnte negative virkninger kunne ses. Denne fremgangsmåde tilrådes, eftersom giftstoffet kan tænkes selektivt at dræbe mindre fisk, forsinke klækningstidspunktet og forårsage grove malformationer og på den måde føre til længdemålinger med bias. Ydermere vil der være stort set samme antal fisk at måle pr. undersøgelse, hvilket sikrer teststatistikkens validitet.

▼B

LC_{50} OG EC_{50}-BESTEMMELSER

Procentdelen af overlevende æg og larver beregnes og korrigeres for mortalitet i kontrollerne efter Abbotts formel (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

hvor

P = korrigeret % overlevelse

P' = % observeret overlevelse i testkoncentrationen

C = % overlevelse i kontrollen

Hvis man ønsker at inkludere morfologiske abnormiteter i EC_{50}-statistikken, kan man finde vejledning i Stephan (5).

ESTIMERING AF LOEC OG NOEC

Et af formålene med æg og blommesækyngelstestene er at sammenligne koncentrationerne over nul med kontrolgruppens, dvs. at bestemme LOEC. Derfor bør multiple sammenligningsprocedurer anvendes (6)(7)(8)(9)(10).

HENVISNINGER

(1) Laale, H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio raid)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka, K.K. and Battle, H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabårbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan, C.E. (198 2). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard ssessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett, C.W, (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams, D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams, D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Tillæg 2

TESTBETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER

Art	Temperatur (°C)	Saltindhold (0/00)	Lysperiode (timer)	Varighed af stadier (dage)		Typisk testvarighed	Overlevelseskontrol (minimum %)	
				Embryoner	Blommesæ-kyngel		Klæknings-succes	Efter klæk-ning
FERSKVAND								
Brachydanio rerio Zebrafisk	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (8-10 dage)	80	90
Oncorhynchus mykiss Regnbueørred	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 20 dage efter klækning (50-5 5 dage)	66	70
Cyprinus carpio Alm. karpe	21-25	—	12-16	5	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	80	75
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastruia-sta-dium) til 5 dage efter klækning (13-16 dage)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4-5	5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-sta-dium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	60	70

(1) Gældende embryoner.
(2) Gældende for larver.
(a) Mørke for embryoner og larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion. Siden svagt lys i resten af testen.

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 1736

▼B

TILLÆG 3

Veldokumenterede testbetingelser, varighed og overlevelseskriterier for andre brugbare arter

Art	Temperatur (°C)	Saltindhold (0/00)	Lysperiode (timer)	Varighed af stadier (dage)		Typisk testvarighed for embryoner og blommesækyngel	Overlevelse kontrol (minimum %)	
				Embryoner	Blommesæ-kyngel		Klæknings-succes	Efter klæk-ning
FERSKVAND								
Carassius auratus Guldfisk	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	—	80
Leopomis macrochirus Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	—	75
SALTVAND								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22-25	15-22	12	1,5	10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (6-7 dage)	80	60
Clupea harengus Sild	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (23-27 dage)	60	80
Gadus morhua Torsk	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (18 dage)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15-30	12	—	—	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-sta-dium) til 4-7 dage efter klækning (28 dage)	> 75	80

▼B

TILLÆG 4

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Substans	Koncentration
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammonium	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organophosphor-pesticider	< 50 ng/l
Total organochlorino-pcsticider + polychlor-biphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

▼B

C.16. HONNINGBIER — AKUT ORAL TOKSICITETSTEST

1. METODE

Denne korttids toksicitetstestmetode svarer til OECD TG 213 (1998).

1.1. INDLEDNING

Denne toksicitetstest er en laboratoriemetode beregnet til at fastlægge den orale akutte toksicitet af plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier på voksne arbejdsbier.

I forbindelse med fastlæggelse og evaluering af stoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at fastslå den akutte orale toksicitet over for honningbier, f.eks. når det er sandsynligt, at bier bliver udsat for stoffet. Den akutte orale toksicitetstest udføres for at fastslå den iboende toksicitet af pesticider og andre kemikalier over for bier. Resultaterne af testen bør anvendes for at fastslå en eventuel nødvendighed af yderligere undersøgelser. Særligt kan metoden anvendes i programmer med henblik på at vurdere de risici, pesticider udgør for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitetstest til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg (l). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og testprocedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

Akut oral toksicitet: er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en oral indtagelse af en enkelt dosis af testkemikaliet.

Dosis: er den mængde af test-kemikaliet, som er indtaget. Dosis udtrykkes som masse (mg) af testkemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde testkemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD_{50} (Mediane letale dosis) oral: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, indtaget oralt. LD_{50}-værdien udtrykkes i mg testkemikalium pr. bi. Hvad pesticider angår, kan testkemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en række doser af testkemikaliet i en rørsukkeropløsning. Derefter får bierne samme føde, men uden testkemikaliet. Mortaliteten noteres daglig i mindst 48 timer og sammenlignes med kontrolværdierne. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. $\leq$ 10 %, bør man forlænge testperioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD_{50} ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

▼B

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— LD_{50} for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Indsamling af bier**

Unge. voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles om morgenen eller om aftenen før brugen og holdes under testbetingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitetsundersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. **Opbevaring og fodringsbetingelser**

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Det er bedst med ti bier pr bur. Størrelsen af testburene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være for tilstrækkelig plads.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % w/v). Efter at testdosis er givet, forsynes bierne med føde ad libitum. Fordringssystemet bør tillade registrering af fødeindtagelse for hvert bur (se 1.6.3.1). Et glasrør, ca. 50 mm langt med 10 mm lysning, med den åbne ende indsnævret til 2 mm, kan anvendes.

1.5.3. **Forberedelse af bierne**

De indsamlede bier fordeles tilfældigt i burene, som placeres tilfældigt i forsøgsrummet.

▼B

Bierne må sulte op til to timer før forsøgets begyndelse. Det anbefales, at bierne sulter før behandlingen, så at alle bier står lige med hensyn til tarmindhold ved forsøgets begyndelse. Moribunde bier skal kasseres og erstattes med sunde bier, før forsøget indledes.

1.5.4. **Fremstilling af doser**

Hvor testkemikaliet er kan blandes i vand. kan det dispenseres direkte i en 50 % rørsukkeropløsning. Der kan i forbindelse med tekniske produkter og stoffer med lav vandopløselighed anvendes hjælpestoffer såsom organiske opløsningsmidler, blødgøringsmidler eller dispergenser med lav toksicitet over for bier (f.eks. acetone, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Hjælpestoffets koncentration afhænger af teststoffets opløselighed og bør være den samme i alle koncentrationer, der undersøges. Imidlertid er en koncentration af hjælpestoffet på 1 % normalt passende og bør ikke overskrides.

Tilsvarende kontroloplø sninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper: en til opløsning i vand og en til rørsukkeropløsning med opløsningsmiddel/hjælpestof med samme koncentration som i forsøgsopløsningerne.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Test- og kontrolgrupper**

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD_{50} med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD_{50}. Fortyndingsfaktor og antal dosiskoncentrationer bør imidlertid beregnes ud fra toksicitetskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosisområdet kan være til hjælp for fastlæggelse af dosiskoncentrationerne.

Mindst tre testgrupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver testkoncentration. Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med testserien. Kontrolgrupper skal også inkluderes til belysning af de opløsningsmidler og hjælpestoffer, der anvendes (se 1.5.4).

1.6.2. **Toksisk standard**

En toksisk standard (dvs. et kendt toksisk stof) skal inkluderes i testserien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD_{50}-værdi. Mindst tre bure. hver med ti bier. skal udsættes for hver testdosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoat, for hvilket det angives, at den orale LD_{50}-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,35 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosisrespons (f.eks. parathion).

▼B

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Hver test-gruppe bier skal forsynes med 100-200 ml 50 % vandig rørsukkeropløsning, indeholdende testkemikaliet i den rigtige koncentration. Større volumen kræves til kemikalier, der er tungt opløselige, har lav toksicitet eller lav koncentration i præparatet, da der skal bruges større mængder i rørsukkeropløsningen. Mængden af behandlet føde, der indtages, skal monitoreres. Når den er indtaget (almindeligvis efter 3-4 timer), skal fodringssystemet fjernes fra buret og udskiftes med et nyt, som kun indeholder rørsukkeropløsning, og som tilføres ad libitum. Nogle stoffer kan i højere doser medføre, at der indtages kun lidt eller ingen føde. Efter højst 6 timer skal resten af den behandlede føde fjernes og erstattes med ren rørsukkeropløsning. Mængden af behandlet føde, der er indtaget, skal beregnes (f.eks. via måling af volumen/vægt af resterende behandlet føde).

1.6.3.2. *Varighed*

Testen varer fortrinsvis til 48 timer efter at testopløsningen er blevet erstattet med ren rørsukkeropløsning. Hvis mortaliteten fortsætter med at stige med mere end 10 % efter de første 24 timer, bør testvarigheden udvides til maksimalt 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4 timer efter testens start og derefter 24 og 48 timer efter (dvs. efter givet dosis). Hvis en længere observationsperiode er nødvendig, registreres yderligere hver 24. time op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

Den mængde føde, der indtages af hver gruppe, skal vurderes. Sammenligning af den hastighed, hvormed den behandlede og den ikke behandlede føde indtages inden for 6 timer, kan skaffe viden om den behandlede fødes smagskvalitet.

Enhver unormal opførsel observeret blandt bierne i forsøgsperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænsetest**

I visse tilfælde (f.eks. hvis et testkemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænsetest, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD_{50} er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate testgrupper til testdosis, de relevante kontroller, vurderingen af indtaget behandlet føde og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se 1.6.4), skal de registreres.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (f.eks. probitanalyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4), Plot dosisresponskurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{5o} med 95 % sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.h.a. Abbotts korrektion (4) (5). Hvis den behandlede føde ikke er totalt indtaget, skal dosis af testkemikalium indtaget pr. gruppe bestemmes. LD_{50} skal udtrykkes som mg testkemikalium pr. bi.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kermske egenskaber (f.eks. stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive strukturformel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Testdyr**

— videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af testbier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3. **Testomstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved fremstilling af stamopløsning og testopløsning (eventuelt opløsningsmiddel og dets koncentration skal angives)

— testdesign, dvs. antal testkoncentrationer og deres størrelse, antal kontroller; for hver testkoncentration og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

▼B

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrationsområder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosisresponskurve ved forsøgets slutning

— LD_{50}-værdier med 95 %-sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for testkemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af LD_{50}

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter oberverede eller målte, f.eks. abnorm opførsel blandt bierne (inklusive manglende indtagelse af testdosis), konsumptionshastighed både hvad angår den behandlede og den ubehandlede gruppe

— enhver fravigelse af testfremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **HENVISNINGER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1. pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol, 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. **HONNINGBIER — AKUT KONTAKTTOKSICITETSTEST**

1. **METHODE**

Denne akut toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 214 (1998).

1.1. INDLEDNING

Denne toksicitetstestmetode er en laboratoriemetode, beregnet til at vurdere den akutte toksicitet over for voksne arbejdshonningbier ved kontakt med plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier.

Ved vurderingen og evalueringen af kemikaliers toksiske karakteristika kan det være ønskværdigt at bestemme den akutte kontakttoksicitet over for honningbier, f.eks. når det er sandsynligt, at bier kan blive udsat for de pågældende kemikalier. Den akutte toksicitetstest udføres for at bestemme pesticiders og andre kemikaliers naturlige toksicitet over for bier. Resultaterne af denne test er tænkt anvendt til at fastslå behovet for yderligere evaluering. Specielt kan metoden bruges i programmer, der evaluerer den fare, som pesticider betyder for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitetstest til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg (1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og testprocedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

Akut kontakt toksicitet: er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en lokal applikation af en enkelt dosis af et kemikalium.

Dosis: er den mængde af test-kemikaliet, som er påført. Dosis udtrykkes som masse (mg) af testkemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD_{50} (Mediane letale dosis) kontakt: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, når det administreres via kontakt. LD_{50}-værdien udtrykkes i mg testkemikalium pr. bi. Hvad pesticider angår, kan testkemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en serie forskellige doser af testkemikaliet, opløst i et passende medie, gennem en direkte applikation på thorax (små dråber). Forsøget varer 48 timer. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. < 10 %, bør man forlænge testperioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD_{50} ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

▼B

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— LD_{50} for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Indsamling af bier**

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand, race osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles aftenen for brugen og holdes under testbetingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitetsundersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. **Opbevaring og fodringsbetingelser**

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Størrelsen af testburene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være tilstrækkelig plads. Det er bedst med ti bier pr. bur.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % w/v) og tilbydes ad libitum under forsøget, idet man anvender et fodringssystem, der kan være et glasrør (ca. 50 mm langt og med en lysning på 10 mm og med den åbne ende indsnævret til 2 mm i diameter).

1.5.3. **Forberedelse af bierne**

De indsamlede bier kan bedøves med carbondioxid eller nitrogen, når testkemikaliet skal appliceres. Mængden af anæstetikum og bedøvelsestiden bør være mindst mulig. Moribunde bier skal kasseres og erstattes af sunde bier, før testen påbegyndes.

1.5.4. **Fremstilling af doser**

Testkemikaliet skal appliceres som en opløsning i et medium, dvs. et organisk opløsningsmiddel eller en vandig opløsning med overfladeaktive stoffer. Som organisk opløsningsmiddel foretrækkes acetone, men andre organiske opløsningsmidler med lav toksicitet over for bier kan bruges (f.eks. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Vandopløselige færdiggjorte produkter og højpolære organiske substanser, som ikke er opløselige i organiske opløsningsmidler, kan være lettere at påføre, hvis de tilberedes i en svag opløsning af kommercielle overfladeaktive stoffer (f.eks.. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Tilsvarende kontrolopløsninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre testkemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper, en behandlet med vand og en med opløsningsmiddel/dispergent.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Test- og kontrolgrupper**

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD_{50}med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD_{50}. Antallet af doser bør imidlertid beregnes ud fra toksiciteteskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosisområdet kan være til hjælp for fastlæggelse af dosiskoncentrationerne.

Mindst tre testgrupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver testkoncentration.

Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med testserien. Hvis der er anvendt et organisk opløsningsmiddel eller et overfladeaktivt stof, skal der inkluderes yderligere tre kontrolgrupper på ti bier hver for opløsningsmidlet eller det overfladeaktive stof.

1.6.2. **Toksisk standard**

En toksisk standard skal inkluderes i testserien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD_{50}-værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver testdosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoat, for hvilket det angives, at kontakt-LD_{50}-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,30 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (f.eks. parathion).

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Bedøvede bier behandles individuelt med lokal applikation. Bierne randomiseres til de forskellige testdoser og kontroller. 1 ml af opløsningen, der indeholder testkemikaliet i den passende koncentration, anbringes med en mikroapplikator på dorsalsiden af thorax af bien. Andre volumina kan anvendes, hvis der er grund til det. Efter applikationen anbringes bierne i testburene og forsynes med rørsukkeropløsning.

1.6.3.2. *Varighed*

Forsøgets varighed er almindeligvis 48 timer. Hvis mortaliteten øger mere end 10 % mellem 24 og 48 timer, skal forsøgsvarigheden forøges til op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontrollerne ikke overstiger 10 %.

▼B

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4, 24 og 48 timer efter applikationen. Hvis det er nødvendigt med en forlænget observationsperiode, skal observationerne foretages med 24-timers intervaller, op til 96 timer, under forudsætning af, at kontrolmortaliteten ikke overstiger 10 %.

Enhver unormal opførsel som observeres i testperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænsetest**

I visse tilfælde (f.eks. hvis et testkemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænsetest, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD_{50} er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate testgrupper til testdosis, de relevante kontroller og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se 1.6.4), skal de rapporteres.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (f.eks. probitanalyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4). Plot dosisresponskurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, (dvs. efter 24, 48 og, hvis relevant. 72 og 96 timer) og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{50}, med 95 %-sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.h.a. Abbotts korrektion (4)(5). LD_{50} skal udtrykkes som mg testkemikalium pr. bi.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Testdyr**

— videnskabeligt navn. race. omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af testbier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

▼B

2.2.3. **Testomstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved administration af testkemikalium (det anvendte opløsningsmedium, volumen af testopløsning, det anvendte anæstetikum

— testdesign, f.eks. antal og størrelse af testdoser, antal kontroller; for hver testdosis og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrationsområder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosisresponskurve ved forsøgets slutning

— LD_{50}-værdier med 95 %-sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for testkemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af LD_{50}

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter, observerede eller målte, og abnorm opførsel blandt bierne

— enhver fravigelse af testfremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **HENVISNINGER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. **ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGTSMETODE**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 106: »Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equili-brium Method« (2000).

1.1. INDLEDNING

I metoden er taget hensyn til en ringtest og en workshop om udvælgelse af jord med henblik på udvikling af en adsorptionstest (1) (2) (3) (4) samt eksisterende guidelines på nationalt plan (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptions-/desorptionsundersøgelser kan skaffe vigtige oplysninger om kemiske stoffers mobilitet og fordeling i biosfærens jord-, vand- og luftcompartments (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Sådanne oplysninger kan anvendes til opstilling af prognoser eller overslagsberegninger f.eks. vedrørende muligheden for kemisk nedbrydning (22) (23), omdannelse og optagelse i organismer (24), udvaskning gennem jordbundsprofilen (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), fordampning fra jorden (21) (29) (30) og afstrømning fra jordoverfladen til naturlige vande (18) (31) (32). Adsorptionsdata kan anvendes til at drage sammenligninger og opstille modeller (19) (33) (34) (35).

Et kemisk stofs fordeling mellem jord- og vandfase er en kompleks proces, som bestemmes af en række forskellige faktorer: stoffets kemiske egenskaber (12) (36) (37) (38) (39) (40), jordens karakteristika (4) (12) (13), (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) samt klimatiske faktorer som nedbør, temperatur, sollys og vind. De mange fænomener og mekanismer, som medvirker ved adsorption af et kemisk stof til jord, kan således ikke fastlægges fuldt ud ved en forenklet laboratoriemodel som nærværende metode. Men uanset at denne tentativt opstillede metode ikke kan dække alle tilfælde, der kan forekomme i miljøet, giver den tilstrækkelige oplysninger om den miljømæssige relevans af adsorptionen af et kemisk stof.

Se også den generelle indledning.

1.2. OMRÅDE

Metodens formål er at gøre det muligt at foretage en skønsmæssig beregning af et stofs adsorption/desorption i jord. Målet er at nå frem til en sorptionsværdi, med hvilken fordelingen under forskellige miljøforhold kan forudsiges; til dette formål bestemmes ligevægts-adsorptionskoefficienter for et kemisk stof på forskellige jordtyper som funktion af jordens egenskaber (f.eks. dens indhold af organisk kulstof, lerindholdet samt jordens struktur og pH). Det er nødvendigt at anvende forskellige jordtyper for at få så bred dækning som muligt af vekselvirkningen mellem et givet stof og naturligt forekommende jordtyper.

I denne metode forstås ved adsorption den proces, hvorved et kemisk stof bindes til overfladen af forskellige jordtyper; der skelnes her ikke mellem forskellige adsorptionsprocesser (fysisk og kemisk adsorption) og processer som overfladekatalyseret nedbrydning, masseadsorption og kemiske reaktioner. Den adsorption, som finder sted på kolloide partikler (diameter < 0,2 μm) dannet af jordarterne, tages ikke i betragtning.

▼B

De jordparametre, som anses for at have størst betydning for adsorptionen, er: organisk kulstofindhold (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), lerindhold og jordstruktur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) samt for ioniserbare forbindelser pH-værdien (3)(4)(42). Andre jordparametre, der kan have indflydelse på adsorptionen/desorptionen af et stof, er effektiv kationudvekslingskapacitet (ECEC), indhold af amorfe jern- og aluminiumoxider, specielt for vulkanske og tropiske jordarter (4), samt virksom overflade (49).

Testen er udviklet med henblik på vurdering af et kemisk stofs adsorption på forskellige jordtyper med varierende organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur samt pH. Testen omfatter tre trin:

Trin 1: Indledende undersøgelse til bestemmelse af:

— forholdet jord/opløsning

— ligevægtstid for adsorptionsprocessen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt

— prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt prøvestoffets stabilitet inden for prøveperioden.

Trin 2: Screeningtest: adsorptionen i fem forskellige jordtyper undersøges adsorptionskinetisk ved én enkelt koncentration og bestemmelse af fordelingskoefficienterne K_d og K_{oc}.

Trin 3: Bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer til fastlæggelse af koncentrationens indflydelse på adsorptionen på jord.

Undersøgelse af desorption ved hjælp af desorptionskinetik/Freundlich desorptionsisotermer (tillæg 1).

1.3. DEFINITIONER OG ENHEDER

Symbol	Definition	Enhed
A_{t_i}	adsorptionsprocent til tiden t_i	%
A_{eq}	adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse prøvestof adsorberet på jorden i løbet af tidsintervallet Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masse prøvestof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt	µg
m_0	masse prøvestof i prøveglasset ved adsorptionstestens begyndelse	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masse prøvestof målt i prøve (v_a^A) til tidspunktet t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse af stoffet i opløsningen ved adsorptionsligevægt	µg
m_{soil}	mængde jordfase, angivet som tør masse jord	g

▼B

Symbol	Definition	Enhed
C_{st}	massekoncentration af stamopløsningen af stoffet	µg cm^{-3}
C_0	initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massekoncentration af stoffet i den vandige fase til tidspunktet t_i for analysens udførelse	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	indhold af stof adsorberet på jorden ved adsoprtionsligevægt	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massekoncentration af stoffet i vandig fase ved adsorptionsligevægt	µg cm^{-1}
V_o	initialt volumen af vandig fase i kontakt med jorden under adsorptionstesten	cm^3
v_a^A	volumen af den prøve, hvro prøvestoffet måles	cm^3
K_d	fordelingskoefficient for adsorption	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof	cm^3 g^{-1}
K_{um}	normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freudlich adsorptionskoefficient	$\mu g^{-1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freudlich-eksponent	
D_{t_i}	desorptionsprocent til tidspunktet t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptionsprocent til tidsintervallet Δt_i	%
K_{des}	tilsyneladende desorptionskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freudlich desorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse af prøvestoffe desorbere fra jorden i lobet af tiden t_i	µg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestoff desorberet fra jorden i lobet af tidsintervallet Δ_{ti}	µg
$m_m^{des}(eq)$	masse af stof. som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	samlet masse af prøvestof desorberet ved desorptionsligevægt	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestof. som stadig er adsorberet på jorden efter tidsintervallet Δ_{ti}	µg
m_{aq}^A	masse af stof. som er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning	µg
$C_s^{des}(eq)$	indhold af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt	µg g^{-1}

▼B

Symbol	Definition	Enhed
$C_{aq}^{des}(eq)$	massekoncentration af prøvestof i vandig fase ved desorptionsligevægt	µg cm^{-3}
V_T	samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget undført med den sekventielle metode	cm^3
V_R	rumfang supermatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning	cm^3
V_a^D	rumfang af prøve udtaget til analyse fra tidspunktet (i) under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode	cm^3
V_r^r	rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetkforsøget (parallelle metode)	cm^3
V_i^F	rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof, ved desorptionsligevægt	cm^3
MB	massebalance	%
m_E	samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin	µg
V_{rec}	rumfang af supermatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt	cm^3
P_{ow}	oktanol/vand fordelingskoefficient	
pKa	dissociationskonstant	
S_w	vandopløselighed	g l^{-1}

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Kendte rumfang af en opløsning af umærket eller radioaktivt mærket prøvestof med kendt koncentration i 0,01 M $CaCl_2$ tilsættes til jordprøver, hvis tørre vægt kendes, og som i forvejen er ekvilibreret i 0,01 M $CaCl_2$. Blandingen omrystes et passende stykke tid. Jordsuspensionerne adskilles derefter ved centrifugering og om ønsket filtrering, og den vandige fase analyseres. Den mængde prøvestof, som er adsorberet på jordprøven, beregnes som forskellen mellem den mængde prøvestof, som i begyndelsen er til stede i oplosningen og den mængde, der er tilbage ved forsøgets slutning (indirekte metode).

Om ønsket kan man vælge at bestemme den adsorberede mængde prøvestof direkte ved analyse af jorden (direkte metode). Denne metode, som indebærer trinvis ekstraktion af jorden med passende opløsningsmiddel, anbefales i tilfælde, hvor koncentrationsforskellen af stoffet i opløsningen ikke kan bestemmes nøjagtigt. Som eksempel på sådanne tilfælde kan nævnes: Prøvestoffet adsorberes på overfladen af prøveglasset, prøvestoffet er ustabilt inden for forsøgets tidsramme, adsorptionen er enten så svag, at der kun fås lille koncentrationsændring i stoffet, eller så stærk, at koncentrationen bliver for lille til at kunne bestemmes nøjagtigt. Anvendes radiomærket stof, kan ekstraktion af jorden undgås ved analyse af jordfasen ved forbrænding og væskescintillationstælling. Væskescintillationstælling er imidlertid en uspecifik teknik, som ikke gør det muligt at skelne mellem moderstof og omdannelsesprodukter; den bør derfor kun anvendes, hvis prøvestoffet er stabilt i hele undersøgelsens varighed.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet. Det anbefales at anvende umærket prøvestof med kendt sammensætning og helst mindst 95 % renhed eller radioaktivt mærket prøvestof af kendt sammensætning og radioaktiv renhed. Anvendes radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald.

Før man udfører en test for adsorption-desorption, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (A.6)

b) damptryk (A.4) og/eller Henrys lovkonstant

c) abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH (C.7)

d) fordelingskoefficient (A.8)

e) umiddelbar biologisk nedbrydelighed (C.4) eller aerob og anaerob omdannelse i jord

f) pKa for ioniserbare stoffer

g) direkte fotolyse i vand (dvs. UV-Vis absorptionsspektrum i vand, kvanteudbytte) og fotonedbrydning på jord.

1.6. PRØVENS ANVENDELIGHED

Prøven kan anvendes på kemiske stoffer, for hvilke en analysemetode med tilstrækkelig nøjagtighed er til rådighed. En vigtig parameter, som kan have betydning for resultaternes pålidelighed, navnlig ved anvendelse af den indirekte metode, er prøvestoffets stabilitet inden for det tidsrum, testen strækker sig over. Det er således en forudsætning, at stabiliteten efterprøves i en indledende undersøgelse; iagttages der en omdannelse i løbet af den tid, testen strækker sig over, anbefales hovedundersøgelsen udført med analyse af både jord- og vandfase.

Man kan komme ud for vanskeligheder med at udføre testen for prøvestoffer med ringe vandopløselighed ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), såvel som for stærkt ladede stoffer som følge af, at koncentrationen i den vandige fase ikke kan bestemmes analytisk med tilstrækkelig nøjagtighed. I sådanne tilfælde må der træffes supplerende foranstaltninger. Vejledning i, hvordan sådanne problemer gribes an. er givet i de pågældende afsnit i denne metode.

Ved testning af flygtige stoffer må der drages omsorg for at undgå tab under behandlingen.

1.7. BESKRIVELSE AF METODEN

1.7.1. **Apparatur og kemiske reagenser**

Standardlaboratorieudstyr, navnlig følgende:

a) Glas eller beholdere til udførelse af forsøgene. Det er vigtigt, at disse glas eller beholdere:

— passer direkte i centrifugen, for at fejl ved håndtering og overførsel kan begrænses til det mindst mulige

— er fremstillet af ikke-reaktive materialer, således at adsorptionen af prøvestoffet på overfladen nedsættes til det mindst mulige.

▼B

b) Til omrystning anvendes overhead-rystebord eller tilsvarende; rystebordet skal holde jorden opslæmmet under omrystningen.

c) Centrifuge: helst af højhastighedstypen, f.eks centrifugalkraft > 3 000 g, temperaturkontrolleret, skal kunne fjerne partikler med diameter over 0,2 μm fra vandige opløsninger. Beholderne skal være tilproppet under omrystning og centrifugering for at undgå tab ved fordampning og væskespild; for at mindske adsorptionen på propperne bør deaktiverede propper anvendes, f.eks. teflonbelagte skrueppropper.

d) Valgfrit: filtreringsapparat, sterile engangsfiltre med 0,2 μm porestørrelse. Filtermaterialet bør udvælges særligt nøje med henblik på at undgå ethvert tab af prøvestof på filtrene; til tungtopløselige prøvestoffer kan filtre af organisk materiale ikke anbefales.

e) Analyseudstyr, som er velegnet til måling af prøvestoffets koncentration.

f) Laboratorievarmeskab, som kan holde temperaturer fra 103 °C til 110 °C.

1.7.2. **Karakterisering og udvælgelse af jord**

Jorden bør være karakteriseret ved tre parametre, som i hovedsagen anses for bestemmende for adsorptionskapaciteten: organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur, samt pH. Som allerede nævnt (jf. »Område«) kan andre fysisk-kemiske jordegenskaber have betydning for et givet stofs adsorption/desorption og bør i så fald tages i betragtning.

Det har meget stor betydning, hvilke metoder der anvendes til karakterisering af jorden, og disse kan have stor indflydelse på resultaterne. Det anbefales derfor, at jordens pH måles i en opløsning af 0,01 M $CaCl_2$ (dvs. den opløsning, der benyttes ved undersøgelse af adsorption/desorption) i henhold til den pågældende ISO-metode (ISO-10390-1). Ligeledes anbefales, at de øvrige relevante jordegenskaber bestemmes efter standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis); derved kan analysen af sorptionsdata baseres på globalt standardiserede jordparametre. Nogen vejledning vedrørende foreliggende standardmetoder til jordanalyse og -karakterisering er givet i henvisning (50-52). Til kalibrering af metoderne til jordbundsanalyse anbefales brug af referencejordtyper.

Vejledning i udvælgelse af jord til adsorptions-/desorptionsforsøgene er givet i tabel 1. De syv udvalgte jordtyper er dem, man finder i tempererede geografiske områder. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af adsorptionen af stoffet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Vejledning i, hvor mange forskellige jordtyper der skal undersøges i de forskellige trin af testen, findes under 1.9. »Testens præstationer«.

Foretrækker man andre jordtyper, bør de være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variation i egenskaber som dem, der er beskrevet i tabel 1, også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.

▼B

Tabel 1

Vejledning i valg af jordprøver til adsorption-desorption

Jordtype	pH-område (i 0,01 M $CaCl_2$)	Organisk kulstofindhold (%)	Lerindhold (%)	Jordstruktur (1)
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	clay
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	clay loam
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	silt loam
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	loam
5	< 4,0-6,0 (2)	< 0,5-1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	loamy sand
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	clay loam/clay
7	|< 4,5	> 10	< 10	sand/loamy sand

(1) I henhold til FAO og US-systemet (85).
(2) Værdierne af de respektive variable bør fortrinsvis ligge i det anførte område. Hvis det imidlertid er vanskeligt at finde passende jordmateriale, kan værdier under den anførte mindsteværdi godtages.
(3) For jordtyper med mindre end 0,3 % organisk kulstof kan sammenhængen mellem organisk kulstofindhold og adsorption være forstyrret. Det anbefales således at anvende jord med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.

1.7.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.7.3.1. *Indsamling*

Der anbefales ikke bestemte prøveudtagningsmetoder eller -redskaber; prøveudtagningsmetoden afhænger af undersøgelsens formål (53)(54)(55)(56)(57){58).

Følgende bør tages i betragtning:

a) Udførlige oplysninger om områdets historie er nødvendige, herunder beliggenhed, plantedække, behandling med pesticider og/eller gødning, biologisk tilvækst eller tilfældig forurening. Anbefalingerne i ISO-standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6) bør følges med hensyn til beskrivelse af prøvetagningsstedet.

b) Prøvetagningsstedet skal være fastlagt ved UTM (universel transversal Mercator-projektion/europæisk horisontal datum) eller geografiske koordinater; dette skulle gøre det muligt at genfinde en bestemt jordtype i fremtiden og kan være en hjælp ved bestemmelse af jorden efter forskellige klassifikationssystemer, som anvendes i andre lande. Endvidere må kun indsamles A-horisont til en maksimal dybde af 20 cm. Specielt gælder for jordtype n.7, at hvis en O_h-horisont indgår i jorden, bør den medtages ved prøveindsamlingen.

Jordprøverne bør transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at der med sikkerhed ikke sker nævneværdige ændringer i jordens oprindelige egenskaber.

▼B

1.7.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Kun når dette ikke er muligt, bør jorden opbevares ved rumtemperatur i lufttørret tilstand. Der anbefales ingen grænse for opbevaringstiden, men har jorden været opbevaret i over tre år, bør den før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold, pH og kationbytningskapacitet.

1.7.3.3. *Håndtering og klargøring af jordprøver til testen*

Jordprøverne lufttørres ved rumtemperatur (fortrinsvis ved 20-25 °C). Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordens sigtes til en partikelstørrelse $\leq$ 2 mm; ved sigtningen følges anbefalingerne i ISO-standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6). Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Fugtindholdet i hver jordtype bestemmes på tre prøver ved opvarmning til 105 °C, indtil vægten ikke længere ændrer sig væsentligt (ca. 12 h). I alle beregninger forstås ved masse af jord den ovntørrede masse, dvs. jordens vægt korrigeret for fugtindhold.

1.7.4. **Klargøring af prøvestof, som skal tilføres jorden**

Prøvestoffet opløses i 0,01 M $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand; $CaCl_2$-opløsningen anvendes som vandig fase for at forbedre centrifugeringen og nedsætte kationbytningen til det mindst mulige. Stamopløsningens koncentration bør fortrinsvis være tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for den anvendte analysemetode. Denne grænse garanterer nøjagtige målinger med hensyn til de her anviste metoder; endvidere bør stamopløsningens koncentration være lavere end prøvestoffets opløselighed i vand.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles umiddelbart før stoffet tilføres jordprøverne og bør opbevares tillukket og mørkt ved 4 °C. Opbevaringstiden afhænger af prøvestoffets stabilitet og dets koncentration i opløsningen.

Kun ved tungtopløselige stoffer ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) kan det være nødvendigt at anvende et passende opløsningsmiddel, når prøvestoffet er vanskeligt at bringe i opløsning. For dette opløsningsmiddel gælder; a) det bør være blandbart med vand, som f.eks. methanol eller acetonitril; b) dets koncentration bør ikke være større end svarende til 1 % af stamopløsningens samlede rumfang og bør være mindre i den opløsning af prøvestof, som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %), og c) det bør ikke være overfladeaktivt eller indgå i lyolytiske reaktioner med prøvestoffet. Brug af opløsningsmiddel bør være angivet og begrundet i rapporteringen af data.

Et andet alternativ ved tungtopløselige stoffer er at tilsætte prøvestoffet til prøvesystemet ved spiking: Prøvestoffet opløses i et organisk opløsningsmiddel, og en lille del heraf tilsættes systemet bestående af jord og 0,01 molær opløsning af $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand. Indholdet af organisk opløsningsmiddel i den vandige fase skal holdes så lavt som muligt, normalt ikke over 0,1 %. Spiking fra en organisk opløsning kan være behæftet med manglende reproducerbarhed af volumen. Derved kan der indføres en ekstra fejlkilde i forsøget, da koncentrationen af prøvestof og hjælpeopløsningsmiddel ikke vil være den samme i alle test.

▼B

1.8. BETINGELSER FOR UDFØRELSE AF ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTEN

1.8.1. **Analysemetode**

De vigtigste parametre, som kan påvirke nøjagtigheden af sorptionsmålingerne, er nøjagtigheden af analysemetoden anvendt til både opløsningsfase og adsorberet fase, prøvestoffets stabilitet og renhed, om sorptionsligevægt opnås, hvor meget opløsningens koncentration ændrer sig, forholdet jord/opløsning og ændringer i jordstrukturen under ekvilibreringen (35)(59-62). Nogle eksempler med relevans for nøjagtigbedsproblematikken er givet i tillæg 2.

Pålideligheden af den anvendte analysemetode skal være kontrolleret i det koncentrationsområde, som forventes at optræde under testen. Eksperimentatoren bør ikke afholde sig fra selv at udvikle en velegnet metode med passende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed, detektionsgrænser og genfindingsgrad. Nedenfor er givet en forsøgsvejledning, som viser udførelsen af en sådan test.

Et passende rumfang 0,01 M $CaCl_2$, f.eks. 100 cm^3, omrystes i 4 h med en afvejet mængde jord, f.eks. 20 g, med stor adsoptionsevne, dvs. stort organisk kulstofindhold; der kan afviges fra de angivne vægtmængder og rumfang afhængigt af, hvad hensynet til analysen kræver, men et forhold jord/opløsning på 1:5 vil være et passende udgangspunkt. Blandingen centrifugeres, og den vandige fase kan eventuelt filtreres. Til den vandige fase tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestof, således at den nominelle koncentration når inden for det koncentrationsområde, der forventes at optræde under testen. Dette rumfang bør højst udgøre 10 % af den vandige fases endelige rumfang, for at forekvilibreringsopløsningens beskaffenhed skal ændres mindst muligt. Opløsningen analyseres.

Én blindprøve bestående af systemets jord + $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof) skal indgå i analysen, for at man kan kontrollere, om analysemetoden medfører artefakter, og om jorden giver matrixvirkninger.

Til sorptionsmåling kan anvendes gas-væskekromatografi (GLC), high-performance væskekromatografi (HPLC), spektrometri (f.eks. GC/massespektrometri, HPLC/massespektrometri) og væskescintillationstælling (ved radioaktivt mærket prøvestof). Uanset den anvendte analysemetode anses det for passende, hvis der genfindes mellem 90 % og 110 % af den nominelle værdi. For at give mulighed for detektion og evaluering efter at adskillelse af faserne har fundet sted, bør analysemetodens detektionsgrænser være mindst to størrelsesordener under den nominelle koncentration.

Karakteristika og detektionsgrænser for den analysemetode, der er til rådighed for adsorptionsundersøgelserne, spiller en vigtig rolle ved fastlæggelse af testbetingelserne og testens samlede præstationer. I denne metode angives en generel forsøgsgang, medens der gives anvisninger og vejledning for alternative løsninger, hvor analysemetode og laboratoriefaciliteter kan sætte begrænsninger.

▼B

1.8.2. **Valg af optimalt jord/opløsning-forhold**

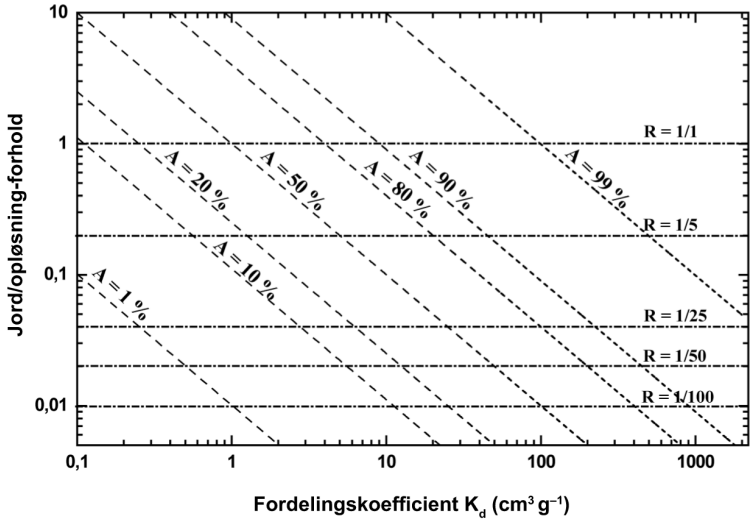
Et passende jord til opløsning forhold for sorptionsundersøgelser vælges ud fra fordelingskoefficienten K_d og den ønskede relative adsorptionsgrad. Den statistiske nøjagtighed, med hvilken stoffets koncentration i opløsningen lader sig bestemme, er givet ved koncentrationsændringen for stoffet i opløsningen, afhængigt af adsorptionsligningens form og analysemetodens grænseværdi. I praksis er det derfor sædvanligvis nyttigt at bestemme sig for nogle få faste forhold, som giver en adsorptionsprocent på over 20 %, helst også > 50 % (62), samtidig med at man sørger for, at prøvestoffets koncentration i den vandige fase er høj nok til at kunne måles nøjagtigt. Dette er særlig vigtigt ved høje adsorptionsprocenter.

En bekvem måde at vælge passende jord/vandforhold på er at basere det på en skønnet K_d-værdi, enten fra de indledende forsøg eller fra tilnærmet beregning med en anerkendt metode (tillæg 3). Derefter kan et passende forhold jord/opløsning vælges ved afsætte en kurve over dette forhold som funktion af K_d for fastlagte adsorptionsprocenter (figur1). Ved optegning af kurven antages adsorptionsligningen lineær ([1]). Det pågældende forhold findes ved at omordne ligning 4 for K_d i samme form som ligning 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

eller i logaritmisk form, idet det forudsættes, at $R = m_{soil}/V_0$ og $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Figur 1. Sammenhæng mellem forholdet jord/opløsning og K_d ved forskellige adsorptionsprocenter for prøvestof.

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Figur 1 viser det ønskede jord/opløsningsforhold som funktion af K_d ved forskellige adsorptionsgrader. F.eks. fås med et forhold jord/opløsning på 1:5 og K_d = 20 en adsorption på ca. 80 %. For at få 50 % adsorption ved samme K_d-værdi skal forholdet være 1:25. Denne måde at vælge passende jord/opløsningsforhold på giver undersøgeren den fleksibilitet, som er nødvendig under forsøgsomstændigheder.

Vanskeligere at håndtere er de områder, hvor det kemiske stof udviser enten meget høj eller meget lav adsorption. I tilfælde af lav adsorption anbefales et jord/opløsningsforhold på 1:1, dog kan det for visse meget organiske jordtyper være nødvendigt med et lavere forhold for at få en vællinglignende konsistens. Der må vises omhu med analysemetoden ved måling af små ændringer i opløsningens koncentration; ellers vil adsorptionsmålingen blive unøjagtig. Hvis fordelingskoefficienten K_d på den anden side er meget høj, kan man gå op til et forhold jord/opløsning på 1:100 for at en væsentlig del af det kemiske stof skal forblive i opløsningen. Der må dog sørges omhyggeligt for god opblanding, og man må give systemet tilstrækkelig tid til at ekvilibreres, En alternativ fremgangsmåde er at forudsige K_d-værdien med teknikker til skønsvis beregning, f.eks. baseret på P_{ow}-værdier (tillæg 3), Især kan dette være nyttigt for lavt adsorberede/polære kemiske stoffer med $P_{ow} < 20$ og for lipofile/stærkt sorptive kemiske stoffer med $P_{ow} > 10^4$.

1.9. TESTENS PRÆSTATIONER

1.9.1. Testbetingelser

Alle forsøg udføres ved rumtemperatur, og om muligt ved konstant temperatur mellem 20 °C og 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserne skal gøre det muligt at fjerne partikler større end 0,2 μm fra opløsningen. Denne værdi medtager den mindste partikel, der betragtes som en faststofpartikel, og danner overgangen mellem faste og kolloide partikler. Vejledning for fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne findes i tillæg 4.

Kan centrifugeringsfaciliteterne ikke garantere fjernelse af partikler over 0,2 μm, kan man eventuelt kombinere centrifugeringen med filtrering med filtre med 0,2 μm porestørrelse. Sådanne filtre skal være fremstillet af passende inaktivt materiale for at undgå tab af prøvestof på dem. Under alle omstændigheder skal det være godtgjort, at filtreringen ikke medfører tab af prøvestof.

1.9.2. **Trin 1 — Indledende undersøgelse**

Formålet med den indledende undersøgelse er beskrevet i afsnittet »Område«. Vejledning for opsætning af en sådan test gives i forbindelse med det nedenfor foreslåede forsøg.

1.9.2.1. *Valg af optimalt forhold jord/opløsning*

Der anvendes to jordtyper og tre forskellige jord/opløsningforhold (seks enkeltforsøg). Den ene jordtype har højt organisk kulstofindhold og lavt lerindhold, medens den anden har lavt organisk kulstofindhold og højt lerindhold. Der foreslås følgende forhold:

— 50 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:1)

▼B

— 10 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:5)

— 2 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:25).

Den mindste mængde jord, som forsøget kan gennemføres på, afhænger af laboratoriefaciliteterne og præstationerne af de anvendte analysemetoder. Dog anbefales det at anvende mindst 1 g, og helst 2 g for at få pålidelige resultater af testen.

Én kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (ingen jord), underkastes nøjagtig de samme procedurer som prøvesystemerne for at kontrollere prøvestoffets stabilitet i $CaCl_2$-opløsning og dets eventuelle adsorption på overfladen af prøvekarrene.

For hver jordtype gennemføres samme testprocedure på en blindprøve med samme jordmængde og et totalt rumfang på 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof). Blindprøven tjener til baggrundskontrol under analysen med henblik på at opdage forstyrrende stoffer eller forurenet jord.

Alle forsøgene, herunder kontrol- og blindforsøg, skal udføres mindst som dobbeltforsøg. Det samlede antal prøver, som skal fremstilles til forsøget, kan beregnes ud fra den metode, der skal anvendes.

Sædvanligvis benyttes samme metoder ved forundersøgelsen og hovedundersøgelsen; undtagelser herfra nævnes i givet fald.

Dagen før forsøgsdagen ekvilibreres de lufttørrede jordprøver ved omrystning med et mindsterumfang på 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ natten over (12 h). Derefter tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøve-stoffet, således at det endelige rumfang justeres til 50 cm^3. Dette tilsatte rumfang stamopløsning: a) må ikke være over 10 % af det endelige rumfang på 50 cm^3 af den vandige fase for ikke at ændre beskaffenheden af forekvilibreringsopløsningen mere end nødvendigt, og b) bør fortrinsvis resultere i, at den prøveopløsning, som er i kontakt med jorden (C_0), har en begyndelseskoncentration mindst to størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden; denne grænse sikrer, at der kan foretages nøjagtige målinger, selv når der optræder stærk adsorption (> 90 %), og giver mulighed for senere bestemmelse af adsorptionsisotermerne. Ligeledes anbefales det, at begyndelseskoncentrationen af det undersøgte stof (C_0) ikke er større end halvdelen af dets opløselighed.

Nedenfor er givet et eksempel på, hvordan stamopløsningens koncentration (C_{st}) beregnes. Det antages, at detektionsgrænsen er 0,01 μg cm^{-3}, og at adsorptionen er 90 %; begyndelseskoncentrationen af prøvestoffet, som er i kontakt med jorden, bør derfor helst være 1 μg cm^{-3} (to størrelsesordener over detektionsgrænsen). Når det forudsættes, at der tilsættes det anbefalede maksimale rumfang stamopløsning, dvs. 5 cm^3 til 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ ekvilibreringsopløsning (= 10 % stamopløsning i 50 cm^3 samlet vandigt rumfang), bør koncentrationen af stamopløsningen være 10 μg cm^{-3}, altså tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden.

pH af den vandige fase bør måles før og efter kontakt med jorden, da den spiller en vigtig rolle i hele adsorptionsprocessen, navnlig for ioniserbare stoffer.

▼B

Blandingen omrystes godt, indtil adsorptionsligevægt er nået. Ligevægtstiden i jord er stærkt varierende og afhænger af det kemiske stof og af jorden; et tidsrum på 24 h er sædvanligvis tilstrækkeligt (77). I forundersøgelsen kan prøverne udtages sekventielt gennem en omrystningsperiode på 48 h (f.eks. 4. 8, 24, 48 h). Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt under hensyntagen til laboratoriets arbejdsplan.

For analyse af prøvestoffet i den vandige opløsning er der to valgmuligheder: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Det må understreges, at skønt den parallelle metode er forsøgsmæssigt mere langstrakt, er den matematiske behandling af resultaterne enklere (tillæg 5). Hvilken metode man vil vælge, er imidlertid op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

a) Den parallelle metode: Der fremstilles prøver med ens jordopløsningforhold, idet antal prøver skal være lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Efter centrifugering og (om ønsket) filtrering opsamles den vandige fase i første prøveglas så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 4 h, væsken i det andet prøveglas efter 8 h, i det tredje prøveglas efter 24 h osv.

b) Den sekventielle metode: Der fremstilles kun en dobbeltprøve for hvert forhold jordopløsning. Ved fastlagte tidsintervaller centrifugeres blandingen for at skille faserne. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Filtreres der efter centrifugeringen, bør laboratoriet have de nødvendige faciliteter til filtrering af små vandige prøver. Det anbefales, at det samlede rumfang af de udtagne prøver ikke udgør over 1 % af opløsningens samlede rumfang, således at man ikke ændrer forholdet jordopløsning væsentligt og nedsætter massen af opløst stof, som er til rådighed for adsorption under testen.

Adsorptionsprocenten A_{t_i} beregnes for hvert tidspunkt (t_i) på grundlag af den nominelle begyndelseskoncentration og den målte koncentration på prøvetagningstidspunktet (t_i), korrigeret for blindværdien. Grafer over som A_{t_i} -funktion af tiden (Figur 1, tillæg 5) optegnes for at vurdere, om der er nået et ligevægtsplateau ([1]). K_d-værdien ved ligevægt beregnes ligeledes. På grundlag af denne K_d-værdi vælges passende forhold jord/opløsning i figur 1, således at adsorptionsprocenten kommer over 20 %, og helst > 50 % (61). Alle de pågældende ligninger og principper for grafisk afbildning er givet i afsnittet om data og rapportering i tillæg 5.

1.9.2.2. *Bestemmelse af ekvilibreringstid for adsorptionen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt*

Som nævnt giver grafer over A_{t_i} eller C_{aq}^{ads} som funktion af tiden mulighed for vurdere, om der er nået adsorptionsligevægt, samt den adsorberede mængde prøvestof ved ligevægt. Figur 1 og 2 i tillæg 5 viser eksempler på sådanne afbildninger. Ekvilibreringstiden er den tid, systemet behøver for at nå et plateau.

([1]) Kurver over koncentrationen af prøvestof i den vandige fase (C_{aq}^{ads}) som funktion af tiden kunne også anvendes til at vurdere, om der nås et ligevægtsplateau (se fig. 2 i tillæg 5).

▼B

Hvis der med en given jord ikke nås et plateau, men fås en konstant stigende værdi, kan det skyldes komplicerende faktorer som biologisk nedbrydning eller langsom diffusion. Biologisk nedbrydning kan påvises ved, at forsøget gentages med en steriliseret prøve af jorden. Hvis der heller ikke i dette tilfælde nås et plateau, bør eksperimentatoren søge efter andre fænomener, som kan tænkes at gøre sig gældende i netop hans undersøgelser; dette kan ske gennem passende ændringer af forsøgsbetingelserne (temperatur, omrystningstid, jord/opløsningforhold). Det er op til eksperimentatoren at afgøre, om testen skal fortsættes, uanset at det måske ikke lykkes at nå ligevægt.

1.9.2.3. *Adsorption af prøvestof på overfladen af prøvebeholderne og prøvestoffets stabilitet*

Ved at analysere kontrolprøverne kan man skaffe sig en del oplysninger om prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt dets stabilitet. Hvis der iagttages en udtynding, som er større end svarende til middelfejlen på analysemetoden, kan der være tale om abiotisk nedbrydning og/eller adsorption på overfladen af prøveglassene. Man vil kunne skelne mellem disse to fænomener ved at vaske prøveglassets vægge grundigt med et kendt volumen af et passende opløsningsmiddel og derefter analysere vaskeopløsningen for prøvestoffet. Hvis der ikke konstateres adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene, er udtyndingen et bevis på abiotisk ustabilitet af prøvestoffet. Hvis der findes adsorption, må der anvendes prøveglas af andet materiale. De af dette forsøg afledte oplysninger om adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene kan imidlertid ikke overføres direkte til jord/opløsningforsøget. Tilstedeværelsen af jord vil indvirke på denne adsorption.

Supplerende oplysninger om prøvestoffets stabilitet kan fås ved bestemmelse af massebalancen for moderstoffet i tid. Dette indebærer, at den vandige fase, ekstrakterne af jord samt prøvekammerets vægge analyseres for prøvestof. Forskellen mellem massen af tilsat prøvestof og summen af masserne af prøvestof i den vandige fase, ekstrakterne fra jord og fra prøveglassets vægge er lig den masse, som er nedbrudt og/eller fordampet og/eller ikke ekstraheret. For at massebalancen kan beregnes, bør der være nået adsorptionsligevægt inden for forsøgsperioden.

Massebalancen beregnes for begge jordprøver og for ét jord/opløsningforhold for hver jordtype, som giver en udtynding over 20 % og helst > 50 % ved ligevægt. Når forsøget til fastlæggelse at forholdet jord/opløsning er fuldført med analyse af den sidste prøve af den vandige fase efter 48 h, adskilles faserne ved centrifugering og, om ønsket, filtrering. Der opsamles så meget som muligt af den vandige fase, og til jorden tilsættes et passende ekstraktionsopløsningsmiddel (ekstraktionskoefficient mindst 95 %) for at ekstrahere prøvestoffet. Det anbefales at foretage mindst to på hinanden følgende ekstraktioner. Mængden af prøvestof i ekstrakterne fra jord og prøveglas bestemmes, og massebalancen beregnes (ligning 10, data og rapportering). Hvis den er mindre end 90 %, regnes prøvestoffet for ustabilt inden for testperioden. Undersøgelserne kan dog i så tilfælde fortsættes, idet der tages hensyn til prøvestoffets ustabilitet; det anbefales da at analysere begge faser i hovedundersøgelsen.

▼B

1.9.2.4. *Trin 2 — Adsorptionskinetik ved én prøvestofkoncentration*

Der anvendes fem jordtyper, udvalgt fra tabel 1. Det vil være en fordel, hvis nogle af eller alle de anvendte jordtyper fra forundersøgelsen i givet fald er med blandt disse fem jordtyper. Derved undgår man at gentage trin 2 for de jordtyper, der er anvendt i forundersøgelsen.

Ekvilibreringstiden, forholdet jord/opløsning, jordprøvens vægt, rumfanget af vandig fase i berøring med jorden og prøvestoffets koncentration i opløsningen vælges på grundlag af resultaterne af forundersøgelsen. Analyse bør helst finde sted efter ca. 2, 4, 6, 8 (eventuelt også 10) og 24 h kontakttid: omrystningstiden kan strækkes til højst 48 h i tilfælde af, at prøvestoffet kræver længere ekvilibreringstid ud fra de resultater, der danner grundlag for fastlæggelse af opblandingsforholdet. Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt.

Hvert forsøg (ét med jord og ét med opløsning) gennemføres mindst som dobbeltforsøg, for at resultaternes overensstemmelse kan vurderes. I hvert forsøg skal indgå én blindprøve. Denne består af jord og 0,01 M $CaCl_2$ opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og rumfang identisk med forsøgets. En kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) underkastes samme testprocedure for at sikre mod det uventede.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt A_{t_i} og/eller tidsinterval $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af behov) og afsættes mod tiden. Desuden beregnes fordelingskoefficienten K_d ved ligevægt og den normaliserede adsorptionskoefficient K_{oc} for organisk kulstof (for upolære organiske stoffer).

Resultaterne af adsorptionskinetikforsøget

Den lineære K_d-værdi giver sædvanligvis en nøjagtig beskrivelse af sorptionsforholdene i jord (35)(78) og er et udtryk for den iboende mobilitet af kemiske stoffer i jord. For eksempel anses kemiske stoffer med $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$ sædvanligvis for kvalitativt mobile. Tilsvarende har MacCall et al. (16) opstillet et system til opdeling efter mobilitet, baseret på K_{oc}-værdier. Endvidere findes der klassifikationssystemer for udvaskning, baseret på sammenhængen mellem K_{oc} og DT-50 ([1]) (32)(79).

1 henhold til fejlanalyseundersøgelser (61) kan K_d-værdier under $0{,}3\ cm^3\ g^{-1}$ desuden ikke beregnes nøjagtigt ud fra et fald i koncentrationen i den vandige fase, selv når der anvendes det (fra en nøjagtighedssynsvinkel) gunstigste forhold jord/opløsning, dvs. 1:1. I så tilfælde anbefales det analysere begge faser — jord og opløsning.

([1]) DT-50: den tid, der forløber, til 50 % af prøvestoffer er nedbrudt.

▼B

Vedrørende ovenstående bemærkninger anbefales det. at undersøgelsen af adsorptionsforholdene for et kemisk stof i jord og dets potentielle mobilitet fortsættes med bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer for disse systemer, for hvilke K_d kan bestemmes nøjagtigt ved brug af forsøgsprotokollen i denne testmetode. Nøjagtig bestemmelse er mulig, såfremt multiplikation af K_d med forholdet jord/opløsning giver en værdi > 0,3, når målingerne baseres på koncentrationsfaldet i den vandige fase (indirekte metode), hhv. > 0,1 når begge faser analyseres (direkte metode) (61).

1.9.2.5. *Trin 3 — Adsorptionsisotermer og desorptionskinetik/desorptionsisotermer*

1.9.2.5.1. Adsorptionsisotermer

Der anvendes fem prøvestofkoncentrationer, helst således at de spænder over to størrelsesordener; valg af disse koncentrationer bør ske på grundlag af vandopløseligheden og den resulterende ligevægtskoncentration i vand. For hver jordtype bør anvendes samme forhold jord/opløsning i hele undersøgelsen. Adsorptionstesten udføres som ovenfor beskrevet, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang efter forløb af den nødvendige tid til indtræden af ligevægt som tidligere bestemt i trin 2. Ligevægtskoncentrationerne i opløsningen bestemmes, og den adsorberede mængde beregnes enten ud fra svindet af prøvestof i opløsningen eller ved hjælp af den direkte metode. Den adsorberede masse pr. masseenhed jord afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet (se »Data og rapportering«).

Resultater af bestemmelsen af adsorptionsisotermer

Af de matematiske adsorptionsmodeller, som hidtil er foreslået, er Freundlich-isotermen den oftest anvendte til beskrivelse af adsorptionsprocesser. Mere udførlige oplysninger om fortolkning og betydning af adsorptionsmodeller er givet i henvisning (41)(45)(S0)(81)(S2).

Anmærkning: Det skal nævnes, at man ikke kan sammenholde værdierne af K_F (Freundlich-adsorptionskoefficienten) for forskellige stoffer, medmindre de pågældende K_F-værdier udtrykkes i samme enheder (83).

1.9.2.5.2. Desorptionskinetik

Formålet med dette forsøg er at undersøge, om et kemisk stof adsorberes reversibelt eller irreversibelt til en jordtype. Denne oplysning er vigtig, da også desorptionsprocessen spiller en vigtig rolle for et kemisk stofs opførsel i jord på en given lokalitet. Desuden er desorptionsdata nyttige som inddata for computermodeller af et stofs udvaskning og afstrømning i opløst form. Ønskes en desorptionsundersøgelse, anbefales det at udføre nedenstående undersøgelse på hvert system, for hvilket det var muligt at bestemme K_d nøjagtigt i det foregående adsorptionskinetikforsøg.

Ligesom for adsorptionskinetikundersøgelsen kan der vælges: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Valg af metode er op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

▼B

a) Den parallelle metode: For hver jordtype, som udvælges til desorptionsundersøgelsen, fremstilles prøver med ens jord/opløsning forhold, således at antal prøver er lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Tidsintervallerne bør helst være de samme som i adsorptionskinetikforsøget; dog kan den samlede tid om nødvendigt forlænges, for at systemet kan nå desorptionsligevægt. I hvert forsøg (én jordtype, én opløsning), køres én blindprøve. Blindprøven består af jord og 0,01 M $CaCl_2$-opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og volumen identisk med forsøgets. Som kontrolprøve underkastes prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) samme testprocedure. Alle blandingerne af jord og opløsning omrystes, til adsorptionsligevægt er nået {som tidligere bestemt i trin 2). Derefter adskilles faserne ved centrifugering, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof, og de nye blandinger omrystes igen. Den vandige fase i første prøveglas opsamles så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 2 h, væsken i det andet prøveglas efter 4 h, i det tredje prøveglas efter 6 h, osv., indtil desorptionsligevægt er nået.

b) Den sekventielle metode: Efter adsorptionskinetikforsøget centrifugeres blandingen, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof. Den nye blanding omrystes, indtil desorptionsligevægt er nået. I dette tidsrum centrifugeres blandingen ved fastlagte tidsintervaller, så faserne adskilles. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Rumfanget af hver enkelt prøve skal være mindre end 1 % af det samlede rumfang. Der tilsættes samme mængde frisk fremstillet 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til blandingen for at bevare uændret forhold mellem jord og opløsning, og omrystningen fortsætter indtil næste tidsinterval.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt ((D_{t_i})) og/eller tidsinterval ($(D_{\Delta t_i})$) (afhængigt af, hvad undersøgelsen kræver) og afsættes mod tiden. Desorptionskoefficienten K_{des} ved ligevægt beregnes ligeledes. Alle de ligninger, som skal anvendes, er givet i afsnittet »Data og rapportering« og i tillæg 5.

Resultater af desorptionskinetikforsøget

Fælles afbildninger af desorptionsprocenten D_{t_i} og adsorptionsprocenten A_{t_i} som funktion af tiden giver mulighed for at at vurdere adsorptionsprocessens reversibilitet. Hvis desorptionsligevægt nås. selv om det tager dobbelt så lang tid som at nå adsorptionsligevægt, og hvis den samlede desorption udgør over 75 % af den adsorberede mængde, anses adsorptionen for reversibel.

1.9.2.5.3. Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermer bestemmes for de jordtyper, som anvendes i forsøget til bestemmelse af adsorptionsisotermer. Desorptionstesten udføres som beskrevet i afsnittet »Desorptionskinetik«, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang, ved desorptionsligevægt. Den samlede masse desorberet prøvestof beregnes. Indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet i opløsningen (se »Data og rapportering« samt tillæg 5).

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

Analysedata fremlægges i tabelform (se tillæg 6). Enkeltmålinger og beregnede gennemsnit angives. Der gives grafiske fremstillinger af adsorptionsisotermerne. Beregningerne foretages som nedenfor beskrevet.

I forsøget sættes vægten af 1 cm^3 vandig opløsning til 1 g. Forholdet jord/opløsning kan angives i enheder w/w eller w/vol. med samme talværdi.

2.1. ADSORPTION

Adsorptionen (A_{t_i}) defineres som den procentdel af det fra forsøgets begyndelse tilstedeværende stof, som adsorberes på jorden under de givne forsøgsbetingelser. Såfremt prøvestoffet er stabilt og ikke i nævneværdig grad adsorberes til beholderens væg, beregnes adsorptionsprocenten A_{t_i} til hvert af tidspunkterne t_i efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

hvor:

A_{ti} = adsorptionsprocent til tiden t_i (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i (µg)

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan den procentuelle adsorption A_{t_i} beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, findes i tillæg 5.

Fordelingskoefficienten K_d er forholdet mellem indholdet af stoffet i jordfasen og massekoncentrationen af stoffet i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af ligevægt.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

hvor:

$C_s^{ads}(eq)$ = indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved adsorptionsligevægt (µg cm^{-3}). Koncentrationen bestemmes ved analyse under hensyntagen til resultaterne af blindprøverne

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

m_{soil} = mængde jordfase, angive; som tor masse af jord (g)

V_0 = begyndelsesrumfang af vandig fase i kontakt med jorden (cm^3).

Forholdet mellem A_{eq} og K_d er givet ved;

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

hvor:

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt, %.

Den normaliserede adsorptionskoefficient for organisk kulstof K_{oc} angiver sammenhængen mellem fordelingskoefficienten K_d og jordprøvens organiske kulstofindhold:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

hvor:

% oc = procentdel organisk kulstof i jordprøven (g g^{-1}).

K_{oc}-koefficienten angiver ved én enkelt værdi fordelingen af hovedsagelig ikke-polære organiske stoffer mellem organisk kulstof i jord eller slam og vand. Adsorptionen af sådanne kemiske stoffer er korreleret med det organiske indhold af det sorberende faste stof (7); således afhænger K_{oc}-værdierae af de særlige karakteristika af humusfraktionerne, hvis sorptionsevne afviger betydeligt som følge af forskelle i oprindelse, tilblivelse osv.

2.1.1. **Adsorptionsisotermer**

Freundlich-adsorptionsisotermligningen giver sammenhængen mellem den adsorberede mængde prøvestof og koncentrationen af opløst prøvestof ved ligevægt (ligning 8).

Data behandles som angivet under »Adsorption«, og for hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof adsorberet på jorden efter adsorptionstesten $C_s^{ads}(eq)$) (andetsteds betegnet x/m). Det antages, at der er indtrådt ligevægt, og at $C_s^{ads}(eq)$ udtrykker ligevægtsværdien:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsligningen er vist i (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

hvor:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficient; den har kun dimensionen $cm^3\ g^{-1}$, såfremt l/n = 1: i alle andre tilfælde indføres hældningen l/n i dimensionen af K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ ($cm^{31/n}\ g^{-1}$)

n = regressionskonstant; l/n ligger sædvanligvis i intervallet 0,7 - 1,0, hvilket viser, at sorptionsdata ofte er let ulineære.

Ligning 8 og 9 afsættes, og værdierne af K_F^{ads} og l/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 9. Korrelationskoefficienten r^2 for den logaritmiske ligning beregnes ligeledes. Et eksempel på sådanne afbildninger er givet i figur 2.

▼B

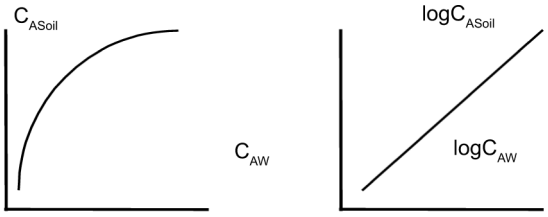


Fig. 2. Freundlich adsoprtionskurve, normal og lineariseret.

2.1.2. **Massebalance**

Massebalancen (MB) defineres som den procentdel af den nominelle mængde stof ved testens begyndelse, som kan genfindes analytisk efter en adsorptionstest.

Behandlingen af data vil afvige, hvis det opløste stof er fuldstændig blandbart med vand. For opløsningsmidler blandbare med vand kan man ved at behandle data som beskrevet under »Desorption« bestemme den mængde stof, som genfindes ved ekstraktion med opløsningsmiddel. Er opløsningsmidlet mindre blandbart med vand, må den genfundne mængde bestemmes.

Beregning af massebalancen MB for adsorption: leddet (m_E) antages at svare til den samlede masse prøvestof ekstraheret af jorden og fra prøveglassets overflade med organisk opløsningsmiddel:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

hvor:

MB = massebalance (%)

m_E = samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin (μg)

C_0 = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden (ug cm^{-3})

V_{rec} = rumfang supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt (cm^{-3}).

2.2. DESORPTION

Desorptionen (D) defineres som den procentdel af den tidligere adsorberede stofmængde, som desorberes under forsøgsbetingelserne:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

hvor:

D_{ti} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet fra jorden til tiden t_i (µg)

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden ved adsorptionsligevægt (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan desorptionsprocenten D_{t^i} beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, er givet i tillæg 5.

Den tilsyneladende desorptionskoefficient (K_{des}) er forholdet mellem indholdet af resterende stof i jordfasen og massekoncentrationen af desorberet stof i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af desorptionsligevægt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

hvor:

K_{des} = desorptionskoefficient ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = samlet masse af prøvestof desorberet fra jorden ved desorptionsligevægt (µg)

V_T = samlet masse af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Vejledning tor beregning af $m_{aq}^{des}(eq)$ (eq) findes i tillæg 5 under overskriften »Desorption«.

Bemærkning:

Hvis den efterfølgende adsorptionstest blev udført med den parallelle metode, sættes rumfanget V_T i ligning 12 lig V_0.

2.2.1. **Desorptionsisotermer**

Freundlich-ligningen for adsorptionsisotermer udtrykker sammenhængen mellem den mængde prøvestof, som stadig er absorberet på jorden, og koncentrationen af prøvestof ved desorptionsligevægt (ligning 16).

For hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, på følgende måde:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ defineres som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

hvor:

$C_s^{des}(eq)$ = indhold af prøvestof, som ved desorptionsligevægt stadig er adsorberet til jorden (µg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt (µg)

▼B

m_{aq}^{A} = masse af prøvestof, som på grund af ufuldstændig volumenudskiftning er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægtt (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = rumfang opløsning, som ved desorptionsligevægt er udtaget af prøveglasset med henblik på bestemmelse af prøvestof (cm^3)

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (cm^3).

Freundlich-desorptionsligningen er vist i (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

hvor:

K_F^{des} = Freundlich-desorptionskoefficient

n = regressionskonstant

$C_{aq}^{des}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved desorptionsligevægt (μg cm^{-3}).

Ligningerne 16 og 17 kan afsættes grafisk, og værdien af $K_F{}^{des}$ og l/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 17.

Bemærkning:

Hvis Freundlich-adsorptions- eller desorptionseksponenten l/n er lig 1, vil Freundlich-bindingskonstanten for adsorption eller desorption (K_F^{ads} og K_F^{des}) være lig ligevægtskonstanterne (K_d og K_{des}) for henholdsvis adsorption og desorption, og ved afbildning af C_s mod C_{aq} fås en ret linje. Er eksponenterne forskellige fra 1, bliver en afbildning af C_s som funktion af C_{aq} ulineær, og adsorptions- og desorptionskonstanterne vil ændre sig langs isotermerne.

2.2.2. **Testrapport**

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

a) fuldstændig identifikation af de anvendte jordprøver, med angivelse af:

b) stedsbestemmelse for lokaliteten (bredde og længde)

c) prøveindsamlingsdato

▼B

d) anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

e) dybde af prøvetagning

f) sand-/silt-/lerindhold

g) pH-værdi (i 0,01 M $CaCl_2$)

h) organisk kulstofindhold

i) indhold af organisk stof

j) kvælstofindhold

k) C/N-forhold

l) kationbytningskapacitet (mmol/kg)

m) udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

n) når det er hensigtsmæssigt, alle relevante oplysninger til fortolkning af prøvestoffets adsorption/desorption

o) henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

p) oplysninger om prøvestoffet, hvis det er hensigtsmæssigt

q) forsøgstemperaturen

r) centrifugeringsbetingelser

s) analysemetode anvendt til analyse af prøvestoffet

t) begrundelse af enhver brug af opløsningsmiddel til fremstilling af stamopløsningen af prøvestoffet

u) forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

v) data i henhold til formularbladet (tillæg 6) og grafiske fremstillinger

w) alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af testresultaterne.

3. **HENVISNINGER**

(1) Kukowski H. and Brummer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18.-20. januar 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate. Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 71 2-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), »Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils«, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), »Adsorption-Desorption Phenomena« in Interactions between herbicides and the soil, (R. . Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M.Th., Davidson J. M., and Wierenga P.J., (1974), »An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media«. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), »Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis«, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), »Movement and sorption of chemicals applied to the soil«. Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R.C, Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) »Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils«. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), »Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil« in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney), John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), »Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides«, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), »Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils«. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), »Persistence of herbicides in soil«. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), »Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkyiamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption«, Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977), »Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides«. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J.M., (1973), »Process affecting herbicide action in soil«. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), »Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Boden«. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J.W., (1975), »The interpretation of soil leaching experiments«. in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971), »Pesticide mobility in soils«. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J.W., (1972), »Diffusion and volatilization« in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), »Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system«. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), »Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses«, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.J., (1989), »Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability«. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). »Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils«. J. of Soil Sci., 28, pp. 340-3 50.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), »Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils«. Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), »Sorption estimates for modeling«, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S. M., (1967), »Functional relationship between sorption in soil and chemical structure«. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), »An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils«. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), »Molecular structure of herbicides and their sorption by soils«. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). Theoretical and experimerital relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), »Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology«. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J.L., (1970), »Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil«. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L White and Y. Rothberg., (1968), »Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate«. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981), »Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils«. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), »Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners«. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972), »Adsorption in organic chemicals« in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, »Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils«. Weed Sci. 19; pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), »Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils«. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), »Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations« in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), »Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase«, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis: biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. »Methods of Soil Analysis«, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970), »Precision in pesticide adsorption measurements«. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), »Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine«. Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, »Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system«. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. »Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106«. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), »Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique«. Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), »Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments«, Environ.Qual., 10(3), pp. 382-3S6.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), »Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water«. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), »Sorption of organic substances by soils and sediments«. J. Environm. Sci. Health, Bl 9 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C, (1987), »Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons«. Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A. I. (1980). »Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota« in Aquatic Toxicology (eds),G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), »A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds«. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J.J., Bamvart W. J., Wood S.G., and Means J.C, (1981), »Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption«. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), »Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils«. Chemosphere. Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), »Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité«. Revue de l'Agric. 34 (4), pp. 319-322.

(74) Muller M., Kordel W. (1996), 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere. 32(12), pp, 2493-2504.

(75) Kordel W. Kotthoff G., Muller M. (1995), »HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test«. Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kordel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), »HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases«. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), »The Speed of Attamment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides«. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C, and Harper S.S., (1990), »The retention processes: mechanisms« in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), »Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses«, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), »Interpretation and use of sorption isotherms« in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), »Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils«. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C, (1980), »Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption«. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996). Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

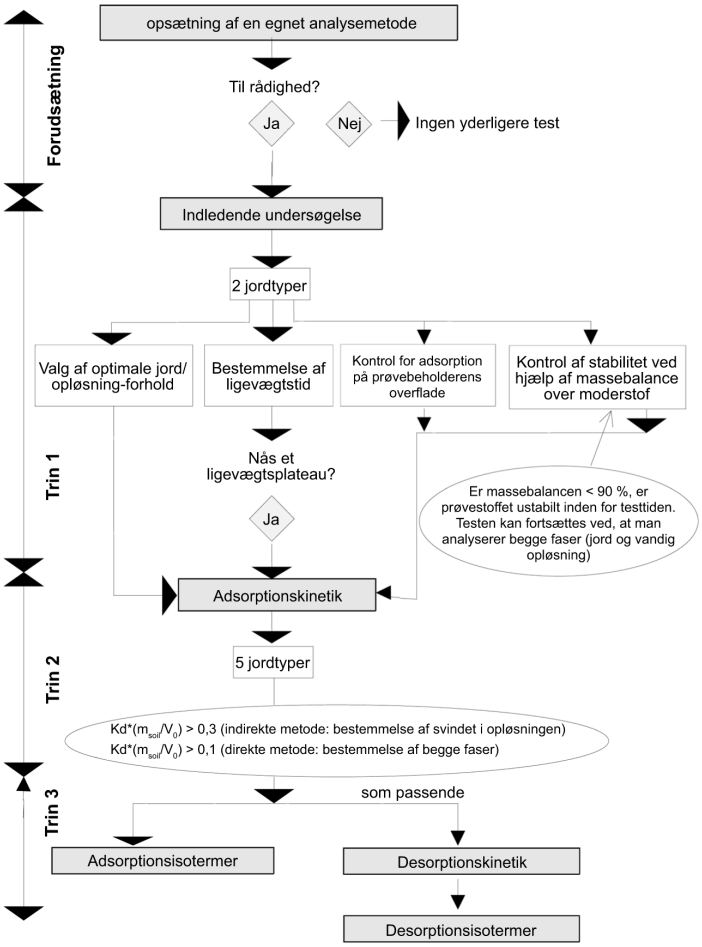
(84) Guth, J.A., (1985), »Adsorption/desorption«, in Joint international Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Arner. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Tillæg 1

Testplan



▼B

Tillæg 2

BETYDNINGEN AF ANALYSEMETODENS NØJAGTIGHED OG KONCENTRATIONSÆNDRINGER FOR ADSORPTIONSRESULTATERNES NØJAGTIGHED

Af følgende tabel (84) ses, at når der er meget lille forskel mellem prøvestoffets begyndelsesmasse (m_0 =110 µg) og ligevægtsmasse (m_{aq}^{ads}(eq)=100 µg) i opløsningen, vil en fejl på 5 % på ligevægtskoncentrationsmålingen føre til en fejl på 50 % på beregningen af den stofmængde, som er adsorberet på jorden (m_s^{ads}(eq)) og på 52,4 % på beregningen af K_d.

Mængde jord mj_{ord} = 10 g

Opløsningens rumfang V_0 =100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (µg)	C_{aq}^{ads}(eq) (µg cm-^{3})	R	m_s^{ads}(eq)* (µg)	C_s^{ads}(eq)* (µg g-^{1})	R‡	K_d*	R‡
	FOR A = 9 %							
m_0= 110 µg eller C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	sand værdi	10	1,00	sand værdi	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	FOR A = 55 %							
m_0= 110 µg eller C_0=1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	sand værdi	60,0	6,00	sand værdi	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	FOR A = 99 %							
m_0 = 110 µg eller C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	sand værdi	108,9	10,89	sand værdi	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

Hvor:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}} . Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

m_s^{ads} (eq) = masse af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg

m_{aq}^{ads} (eq) = masse af prøvestof i vandfasen ved ligevægt, µg

C_s^{ads} (eq) = indhold af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg g-^{1}

C_{aq}^{ads} (eq) = massekoncentration af prøvestoffet i vandig fase ved ligevægt, µg cm-3

R = analysefejl på bestemmelse af m_{aq}^{ads} (eq)

R‡ = beregnet fejl som følge af analysefejl R.

▼B

Tillæg 3

TEKNIKKER TIL SKØNSMÆSSIG BEREGNING AF K_d

1. Ved hjælp af teknikker til skønsmæssig beregning kan størrelsen af K_d forudsiges på grundlag af korrelationer med f.eks. værdier af P_{ow} (12)(39)(63-68), vandopløselighedsdata (12)(19)(21)(39)(68-73) eller polaritetsdata afledt ved brug af omvendt fase HPLC (74-76). Som vist i tabel 1 og 2 beregnes K_{oc} eller K_{om} og dermed indirekte K_d af ligningerne:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. Princippet om disse korrelationer hviler på to forudsætninger: (1) et stofs adsorption er hovedsagelig bestemt af jordens organiske stofindhold, og (2) de indgående vekselvirkninger er hovedsagelig af ikke-polær art. For disse korrelationer gælder følgelig: (1) de gælder ikke eller kun i nogen udstrækning for polære stoffer, og (2) de gælder ikkeved meget lille organisk stofindhold i jorden (12). Desuden gælder, at skønt der er fundet tilfredsstillende korrelation mellem P_{ow} og adsorptionen (19), kan det samme ikke siges om forholdet mellem vandopløselighed og adsorptionsgrad (19)(21); undersøgelser heraf har hidtil givet meget modstridende resultater.

3. Nogle eksempler på korrelationen mellem adsorptionskoefficient og oktanol-vand fordelingskoefficient samt vandopløselighed er givet henholdsvis i tabel 1 og 2.

Tabel 1

Eksempler på korrelation mellem adsorptionsfordelingskoefficienten og oktanol-vand fordelingskoefficienten; flere eksempler er givet i (12) og (68)

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Substituerede urinstoffer	log K_{om} = 0,69 + 0,52 log P_{ow}	Briggs (1981) (39)
Aromatiske klorerede	log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 log P_{ow}	Chiou et al. (198 3) (65)
Forskellige pesticider	log K_{om} = 4,4 + 0,72 log P_{ow}	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiske carbonhydrider	log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 log P_{ow}.	Vowles og Mantoura (1987) (67)

Tabel 2

Eksempler på korrelationen mellem adsorptionsfordelingskoefficient og vandopløselighed; flere eksempler er givet i (68) og (69)

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Forskellige pesticider	log K_{om} = 3,8 - 0,561 log S_w	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiske og aromatiske klorerede forbindelser	log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) log S_w	Chiou et al. (1979) (70)
a-naphtol	log K_{oc} = 4,273 - 0,686 log S_w	Hasset et al. (1981) (71)
Cykliske, alifatiske og aromatiske stoffer	log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 log S_w - 0,00953 (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Forskellige forbindelser	log K_{om} = 2,75 - 0,45 log *Sw*	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Tillæg 4

BEREGNINGER TIL FASTLÆGGELSE AF CENTRIFUGERINGS-BETINGELSER

1. Centrifugeringstiden er givet ved følgende formel, idet partiklerne forudsættes at være kugleformede:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

For enkelhedens skyld er alle parametre angivet i ikke-SI-enheder (g, cm)

hvor

ω = rotationshastighed (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rp = omdrejninger pr. minut

η = opløsningens viskositet, g s-1^{1} cm^{-1}

r_p = partikelradius, cm

ρ_s = massefylde af jord, g cm-^{3}

ρ_{aq} = massefylde af opløsning, g cm-^{3}

R_t = afstand fra centrum af centrifugerotoren til overfladen af opløsningen i centrifugeglasset, cm

R_b = afstand fra centrum af centrifugerotoren til bunden i centrifugeglasset, cm

R_b-Rt = længde af jord/opløsning-blandingen i centrifugeglasset, cm.

I praksis fordobler man sædvanligvis de beregnede tider for at sikre fuldstændig separation.

2. Ligning 1 kan forenkles yderligere, hvis opløsningens viskositet (η) og massefylde (ρ_{aq}) sættes lig viskositeten og massefylden afvand ved 25 °C, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} og $\rho_{aq} = 1{,}0$ g cm^{-3}.

Centrifugeringstiden er da givet ved ligning 2:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 . r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Af ligning 2 ses, at to parametre er vigtige ved fastlæggelse af centrifugeringsbetingelseme, nemlig tid (t) og hastighed (rpm), når man vil udskille partikler med en given størrelse (i vort tilfælde radius 0,1 μm): (1) jordens massefylde og (2) længden af blandingen i centrifugeglasset (R_b-R_t), dvs. den distance, som en jordpartikel tilbagelægger fra overfladen af opløsningen til glassets bund; for et givet rumfang er det klart, at længden af blandingen i røret bestemmes af kvadratet på rørets radius.

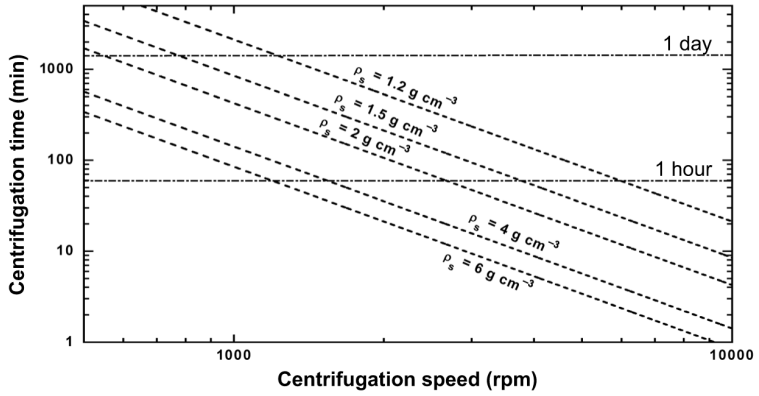
4. Figur 1 viser sammenhængen mellem centrifugeringstiden (t) og centrifugeringshastigheden (rpm) for forskellige jordmassefylder (p_s (Figur la) og forskellige længder af blandingen i centrifugeglassene (Figur 2a). Af figur la ses betydningen af jordens massefylde tydeligt; for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca.240 min for jord med massefylde 1,2 g cm men kun 50 min., når massefylden er 2,0 g cm Tilsvarende ses af figur 1b, at for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca. 50 min for en længde af blandingen på 10 cm men kun 7 min for en længde på 1 cm. Det er imidlertid vigtigt at finde et optimalt forhold mellem den centrifugering, som kræver mindst mulig længde, og den. som gør det let for eksperimentatoren at adskille faserne efter centrifugering.

▼B

5. Ved fastlæggelse af forsøgsbetingelserne med henblik på adskillelse af fast og flydende fase er det desuden vigtigt at tage hensyn til eventuel tilstedeværelse af en tredje »pseudo«-fase, kolloiderne. Disse partikler, der er under 0,2 μm, kan i væsentlig grad påvirke hele absorptionsmekanismen for et stof i en jordsuspension. Når der centrifugeres som ovenfor beskrevet, forbliver kolloiderne i den vandige fase og bliver analyseret sammen med den vandige fase. Derfor går oplysningerne om deres indflydelse tabt.

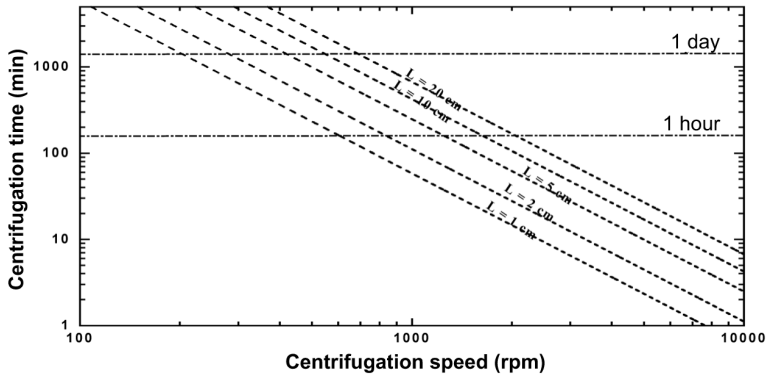
   Hvis det laboratorium, som forestår undersøgelsen, har faciliteter til ultracentrifugering eller ultrafiltrering, kan adsorption/desorption af et stof i jord undersøges mere tilbundsgående, herunder stoffets adsorption på kolloiderne, I så tilfælde bør der anvendes ultracentrifugering ved 60 000 rpm eller ultrafiltrering med en filterporøsitet på 100 000 Dalton til at adskille de tre faser jord, kolloider og opløsning. Den forsøgsprotokol bør desuden ændres tilsvarende, således at alle tre faser analyseres for stoffet.

Figur 1a.



Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centrifugeringshastighed (rpm) ved forskellige jordmas-sefylder (p_s). R_t = 10 cm, R_b-Rt = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} og ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} ved 25 °C.

Fig, 1b.



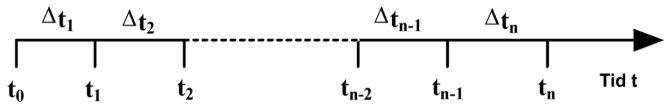
Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centifugeringshastighed (rpm) for forskellige længder af blandingen i centrifugeglasset (R_b-R_t) = L; Rs = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} ved 25 °C og ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Tillæg 5

BEREGNING AF ADSORPTION A (%) OG DESORPTION D (%)

Tidsplanen for proceduren er følgende:



Ved alle beregninger er forudsat, at prøvestoffet er stabilt og ikke adsorberes nævneværdigt til beholderens vægge.

ADSORPTION A (A %)

a) *Den parallelle metode*

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert prøveglas (i) ved hvert tidspunkt (t_i) efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Leddene i denne ligning kan beregnes på følgende måde:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

hvor:

A_{ti} = adsorptionsprocent (%) til tiden t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden på det tidspunkt t_i, da analysen udføres (μg);

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (μg)

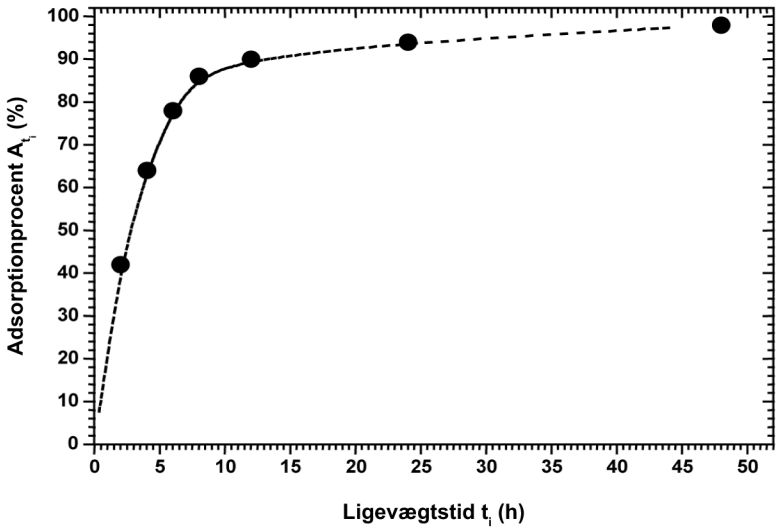
C_0 = initial massekoncentration afprøveopløsning i berøring med jorden (μg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = massekoncentration af stof i vandig fase på det tidspunkt t_i, da analysen udføres (µg cm^{-3}); denne koncentration bestemmes ved analyse med hensyntagen til blindværdierne

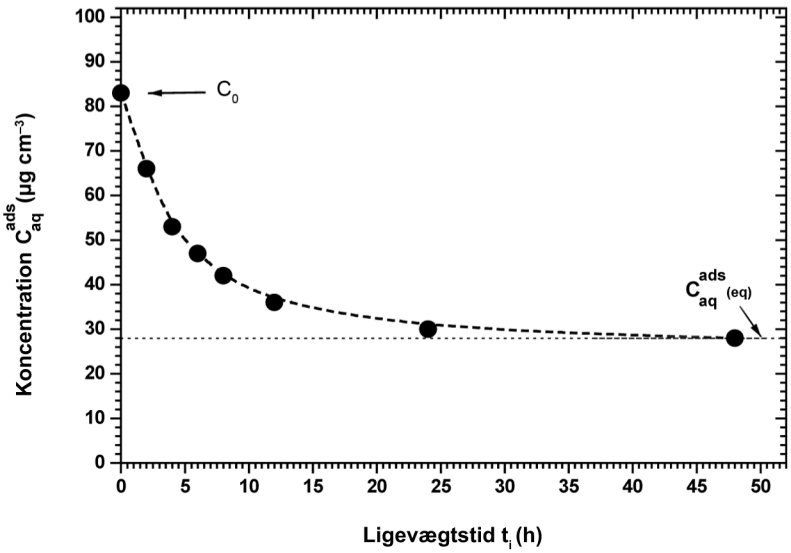
V_0 = initialt rumfang af prøveopløsning i kontakt med jorden (cm^3).

Værdierne af adsorptionsprocenten A_{t_i} eller $C_{aq}^{ads}(t_i)$ afsættes på en kurve mod tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes. Eksempler på sådanne kurver er givet i hhv. figur 1 og figur 2.



Figur 1.

Adsorptionsligevægtskurve.



Figur 2.

Massekoncentration af prøvestoffet i vandfasen (C_{aq}) som funktion af tiden.

▼B

b) *Den sekventielle metode*

I de følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver af vandig fase til bestemte tidsintervaller.

— Inden for hvert tidsinterval beregnes mængden af stof adsorberet på jorden på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— for det tredje tidsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $A_{\Delta t_i}$ beregnes ved følgende ligning:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

medens adsorptionsprocenten A_{t_i} til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptionsværdierne A_{t_i} eller $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes som funktion af tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

— Ved ligevægtstidspunktet t_{eq}:

— er massen af prøvestof adsorberet på jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— er massen af prøvestof i opløsningen:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— og er adsorptionsprocenten ved ligevægt:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

De ovenfor anvendte parametre er defineret som følger:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden henholdsvis i løbet af tidsintervallerne Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve $v_a{}^A$ henholdsvis til tiden t_1, t_2,t_n (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg)

$v_a{}^A$ = rumfang af den prøve, hvori prøvestoffet måles (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = adsorptionsprocent svarende til et tidsinterval Δt_i (%)

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt (%).

DESORPTION D (%)

Tidspunktet t_0 for start af desorptionskinetikforsøget regnes som det tidspunkt, hvor det maksimale opsamlede rumfang af prøvestofopløsningen (efter indtræden af adsorptionsligevægt) erstattes et tilsvarende rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning.

a) *Den parallelle metode*

Til tiden t_i måles massen af prøvestof i den vandige fase udtaget af prøveglas i (V_r^i).og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massen af prøvestof desorberet i et tidsinterval (Δt_1) er givet ved ligningen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorptionsprocenten beregnes:

til tidspunktet t_i af ligningen:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{15}$$

og i et tidsinterval (Δt_1) af ligningen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{16}$$

hvor:

D_{ti} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = desorprionsprocent svarende til et tidsinterval Δti (%)masse af prøvestof desorberet til tidspunktet t_i (μg)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masse af prøvestof desorberet til tidspunktet t_i (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masse af prøvestof desorberet af jorden i løbet af et tidsinterval Δt_1 (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof bestemt analytisk til et tidspunkt t_i i et rumfang opløsning V_r^i, som udtages til analysen (μg)

$m_{aq}{}^{A}$ = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg)

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (cm^3)

V_r^i = rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Værdierne af desorptionen D_{ti} eller $D_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes mod tiden, og tidsrummet til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

b) **Den sekventielle metode**

I følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver (v_a^A) af vandig fase (den sekventielle metode i 1.9. Testens præstationer). Forudsætninger: a) det rumfang supernatant, som er fjernet fra glasset efter adsorptionskinetikforsøget er erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (V_R), og b) det samlede rumfang vandig fase i kontakt med jorden (V_T) under desorptionskinetikforsøget forbliver uændret og er givet ved ligningen:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Til tidspunktet t_i:

— måles massen af prøvestof i en lille prøve (v_a^D), og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— kan desorptionsprocenten D_{t_i} beregnes af følgende ligning:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

I et tidsinterval (Δt_1):

beregnes mængden af stof desorberet i for hvert tidsinterval på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_i\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_1 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

og (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

og (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Endelig beregnes desorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $D_{\Delta t_i}$ ved hjælp af følgende ligning:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

medens desorptionsprocenten D_{t_i}, til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

hvor de ovenfor anvendte parametre er defineret således:

$m^{des}_s(\Delta t_1) m^{des}_s(\Delta t_2),\ldots , m^{des}_s(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof desorberet henholdsvis i løbet af tidsintervallet Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m^{des}_{aq}(\Delta t_1)$, $m^{des}_{aq}(\Delta t_2),\ldots , m^{des}_{aq}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve henholdsvis til tidspunktet t_1, t_2, ..., t_n (µg)

$m^{des}_m(t_1)$, $m^{des}_m(t_2),\ldots , m^{des}_m(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve(v^D_a) henholdsvis til tidspunktet t_1, t_2, ..., t_n (µg)

V_T = samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode (cm^3)

m^A_{aq} = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (µg)

$$m^A_{aq} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i)} \right) \cdot m^{ads}_{aq}(eq) \qquad (26)$$

V_R = rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsnmg (cm^3)

v^D_a = rumfang af prøve udtaget af prøveglas (i) til analyseformål i desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode (cm^3)

$$v^D_a \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Tillæg 6

ADSORPTION-DESORPTION I JORD: DATARAPPORTERINGSBLADE

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysemetodens egnethed

Afvejet jord	g	
Jord: tør masse	g	
Rumfang $CaCl_2$-opløsning	cm^3	
Nominel koncentreret endelig opløsning	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analytisk bestemt koncentreret endelig opløsning	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princip i anvendt analysemetode:

Kalibrering af analysemetode:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

Direkte ☐

Adsorptionstest: udtagne prøver

	Symbol	Enhed	Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid	
Prøveglas nr.										
Afvejet jord	—	g								
Jord: tør masse	m_{Soil}	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	cm^3								
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		cm^3								
Rumfang stamopløsning		cm^3								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3								
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masse af prøvestof ved testens begyndelse	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Enhed	Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid		Ekvilibre-ringstid	
Efter omrøring og centrifugering										
INDIREKTE METODE										
Parallelle metode										
Koncentration af prøvestof i vandig fase inklusive korrektion for blindværdi	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm-^{3}								
Sekventielle metode										
Målt masse af prøvestof i prøve V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
DIREKTE METODE										
Masse af prøvestof adsorberet på jord	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Beregning af adsorption										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionstest: blindprøver og kontrolprøver

	Symbol	Enhed	Blindprøve		Blindprøve		Kontrolprøve	
Glas nr.								
Afvejet jord		g					0	0
Mængde vand i afvejet jord (beregnet)		cm^3					—	—
Tilsat rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning		cm^3						
Tilsat rumfang stamopløsning af prøvestof		cm^3	0	0				
Samlet rumfang vandig fase (beregnet)		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Enhed	Blindprøve		Blindprøve		Kontrolprøve	
Begyndelseskoncentration af prøvestof i vandig fase		µg cm^{-3}						
Efter omrøring og centrifugering								
Koncentration i vandig fase		µg cm^{-3}						

Bemærkning: Tilføj flere kolonner om nødvendigt.

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): .....

Temperatur: .....

Massebalance

	Symbol	Enhed				
Prøveglas nr.						
Afvejet jord	—	g				
Jord: tør masse	m_{soil}	g				
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	ml				
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		ml				
Rumfang stamopløsning		cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3				
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	µg cm^{-3}				
Ekvilibreringstid	—	h				
Efter omrøring og centrifugering						
Koncentration af prøvestof i vandig fase ved adsorptionslige-vægt inklusive blindværdikorrektion	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Ekvilibreringstid	t_{eq}	h				
Første fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang vandig fase	v_{rec}	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	ΔV	cm^3				
Første ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddel	S_{E1}	var.				
Koncentreret prøvestof i opløsningsmiddel	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbol	Enhed				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E1}	µg				
Anden fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang opløsningsmiddel	ΔV_S	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	ΔV	cm^3				
Anden ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddelfase	S_{E2}	var.				
Koncentreret prøvestof i opløsningsmiddel	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E2}	µg				
Samlet masse prøvestof ekstraheret i to trin	m_E	µg				
Massebalance	MB	%				

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionsisotermer

	Symbol	Enhed								
Prøveglas nr.										
Afvejet jord	—	g								
Jord: tør masse	E	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	cm^3								
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		cm^3								
Tilsat rumfang stamopløsning		cm^3								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jorden (beregnet)	V_0	cm^3								
Koncentration, opøsning	C_0	µg cm^{-3}								
Ekvilibreringstid	—	h								

▼B

	Symbol	Enhed								
Efter omrøring og centrifugering										
Stofkoncentration, vandig fase, inklusive blindkorrektion	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatur		°C								
Adsorptionsmasse pr. enhed jord	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressionsanalyse:

størrelse af K_F^{ads}:

størrelse af l/n:

regressionskoefficient r^2:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

Desorptionstest

		Symbol	Enhed	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval
Prøveglas ner. fra adsorptionstrin							
Masse af stof adsorberet til jord ved adsorptionsligevægt		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
Fjernet rumfang vandig fase, erstattet med 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i berøring med jorden	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning		m_{aq}^{A}	µg				
Desorptionskinetik							
Målt mass stof desorberet fra jorden til tiden t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof	PM	V_f^{i}	cm^3				
	SM	v_a^{D}	cm^3				
Masse stof desorberet fra jorden til tiden t_i (beregnet)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masse stof desorberet fra jorden i tidsintervallet Δt_i (beregnet)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Enhed	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval
Desorptionsprocent						
Desorption til tiden t_i	D_{t_i}	%				
Desorption til tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Tilsyneladende desorptionskoefficent	K_{des}					

PM: Parallelle metode.

SM: Sekventielle metode.

▼B

C.19. BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{oc}) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 121 (2000).

1.1. INDLEDNING

Stoffers sorptionsegenskaber i jord og kloakslam kan beskrives ved parametre, som bestemmes eksperimentelt med prøvemetode C.18. En vigtig parameter er adsorptionskoefficienten, der defineres som forholdet mellem stoffets koncentration i jord/slam og stoffets koncentration i den vandige fase ved adsorptionsligevægt. Adsorptionskoefficienten normaliseret efter jordens organiske kulstofindhold. K_{oc} er nyttig som indikator for et kemisk stofs bindingsevne til organisk materiale i jord og kloakslam og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Denne parameter kan bestemmes ved korrelering med vandopløseligheden og fordelingskoefficienten i n-oktanol/vand (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes HPLC til bestemmelse af adsorptionskoefficienten K_{oc} i jord og i kloakslam (8). De derved beregnede værdier er mere pålidelige end dem, der bygger på QSAR-beregninger (9). Som beregningsmetode kan den ikke helt erstatte batch-ligevægtsforsøgene i prøvemetode C.18. Den beregnede K_{oc}-værdi kan imidlertid være nyttig ved valg af passende testparametre til adsorptions-/desorptionsundersøgelser med prøvemetode C.18 gennem beregning af K_d (fordelingskoefficient) eller K_f (Freundlich-adsorptionskoefficient) efter ligning 3 (jf. 1.2).

1.2. DEFINITIONER

K_d: Fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne C af et opløst prøvestof i et tofasesystem bestående af et sorptionsmiddel (jord eller kloakslam) og en vandig fase; den er dimensionsløs, når koncentrationerne i begge faser udtrykkes på w/w basis. Angives koncentrationen i den vandige fase på vægt/volumen basis, bliver enheden ml g^{-1}. K_d kan variere med absorptionsmidlets egenskaber og kan være koncentrationsafhængig.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; eller \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

hvor:

C_{soil} = ligevægtskoncentration af prøvestof i jord (µg g^{-1})

C_{siudge} = ligevægtskoncentration af prøvestof i slam (µg g^{-1})

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase (µg g^{-1}, µg ml^{-1}).

▼B

K_f: Freundlich-adsorptionskoefficienten defineres som prøvestoffets koncentration i jord eller kloakslam (x/m), når ligevægtskoncentrationen C_{aq} den vandige fase er lig én; enheden er μg g^{-1} adsorptionsmiddel. Størrelsen kan afhænge af adsorptionsmidlets egenskaber.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

hvor:

x/m = mængde prøvestof x (μg) adsorberet på en mængde adsorptionsmiddel m (g) ved ligevægt

l/n = Freundlich-adsorptionsisotermens hældning

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof; vandig fase (μg ml^{-1})

Ved $C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc}: Fordelingskoefficient (K_d) eller Freundlich-adsorptionskoefficient (K_f) normaliseret efter adsorptionsmidlets organiske kulstofindhold (f_{oc}); denne er navnlig for uioniserede kemiske stoffer en vigtig indikator for størrelsen af adsorptionen mellem et stof og adsorptionsmidlet og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Alt efter dimensionen af K_d og K_f kan K_{oc} være dimensionsløs eller have enheden ml g^{-1}eller μg g^{-1}organisk stof.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \left(\text{dimensionsløs eller ml} \cdot g^{-1}\right) \text{ eller } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} \left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Forholdet mellem K_{oc} og K_d er ikke altid lineært, således kan K_{oc}-værdierne variere fra jordtype til jordtype, dog med langt mindre variabilitet end K_d eller K_f.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc} afledes af kapacitetsfaktoren (k') ved hjælp af en kalibreringskurve over log k' som funktion af $\log_{oc}$ for de valgte referencestoffer.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

hvor:

t_R: = HPLC-retentionstiden for prøve- og referencestof (minutter)

t_0: = HPLC-dødtid (minutter) (se 1.8.2).

P_{ow}: Oktanol-vand-fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem koncentrationerne af opløst stof i n-oktanol og vand; den er dimensionsløs.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENCESTOFFER

Før metoden anvendes, bør man kende strukturformel, renhed og eventuel dissociationskonstant. Det er nyttigt at kende opløselighed i vand og organiske opløsningsmidler, oktanol-vand-fordelingskoefficient og hydrolyseegenskaber.

▼B

For at korrelere de målte HPLC-retentionsdata for et prøvestof med dets adsorptionskoefficient K_{oc} må der opstilles en kalibreringskurve over log K_{oc} som funktion af log k'. Der kræves mindst seks referencepunkter, heraf mindst ét over og ét under den forventede værdi for prøvestoffet. Metodens nøjagtighed kan forbedres væsentligt ved at anvende referencestoffer, som er strukturmæssigt beslægtet med prøvestoffet. Foreligger sådanne data ikke, er det op til brugeren at vælge passende kalibreringsstoffer. I så fald bør der vælges et mere generelt sæt strukturmæssigt forskelligartede stoffer. De stoffer og K_{oc}-værdier, som kan anvendes, er i tillægget angivet i tabel 1 for kloakslam og tabel 3 for jord. Valg af andre kalibreringsstoffer bør begrundes.

1.4. PRØVEMETODENS PRINCIP

Der udføres HPLC på analysekolonner pakket med en gængs cyanopropyl-faststoffase med både lipofile og polære grupper. Der anvendes en moderat polær stationær fase baseret på silicamatrix:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silica	ikke polært fyldstof	polær gruppe

Prøvemetodens princip svarer til prøvemetode A.8 (fordelingskoefficient, HPLC-metode). Når prøvestoffet føres gennem kolonnen sammen med den mobile fase, reagerer prøvestoffet med den stationære fase. Prøvestoffets fordeling mellem mobil og stationær fase bevirker, at det bliver forsinket. Den stationære fases dobbelte sammensætning med både polære og upolære bindingssteder giver mulighed for interaktion med de polære og ikke-polære grupper i et molekyle på samme måde som det er tilfældet for et organisk stof i en grundsubstans af jord eller kloakslam. Derved er det muligt at fastlægge forholdet mellem retentionstiden på søjlen og adsorptionskoefficienten på organisk materiale.

pH har væsentlig indflydelse på sorptionsegenskaberne, navnlig af polære stoffer. I landbrugsjord og i tanke i spildevandsbehandlingsanlæg ligger pH normalt mellem 5,5 og 7,5. For ioniserbare stoffer bør der udføres to forsøg med både den ioniserede og den ikke-ioniserede form i passende bufferopløsninger, dog kun når mindst 10 % af prøvestoffet er dissocieret ved pH mellem 5,5 og 7,5.

Da vurderingen alene bygger på forholdet mellem retentionen på HPLC-kolonnen og adsorptionskoefficienten, er en kvantitativ analysemetode unødvendig, og kun retentionstiden behøver bestemmes. Hvis man råder over et egnet sæt referencestoffer og kan anvende standardiserede forsøgsbetingelser, er dette en hurtig og effektiv metode til at få et skøn over adsorptionskoefficienten K_{oc}.

1.5. PRØVENS ANVENDELIGHED

HPLC-metoden kan anvendes på kemiske stoffer (mærkede eller umærkede), til hvilke der findes et egnet detektionssystem (f.eks. spektrofotometer, strålingsdetektor), og som er tilstrækkeligt stabile inden for forsøgsvarigheden. Den kan især være nyttig for kemiske stoffer, som er vanskelige at undersøge i andre eksperimentelle systemer (f.eks. stoffer, som er flygtige, eller hvis vandopløselighed er for ringe til at give målelige koncentrationer, og stoffer med høj affinitet til inkuberingssystemernes overflade). Metoden er anvendelig til blandinger, som giver dårligt adskilte elueringsbånd. I så fald bør øvre og nedre grænse for log K_{oc}-værdierne af stofferne i testblandingen angives.

▼B

Urenheder kan undertiden vanskeliggøre fortolkningen af HPLC-resultater, men er dog af underordnet betydning, når blot prøvestoffet kan identificeres sikkert ad analytisk vej og kan adskilles fra urenhederne.

Metoden er valideret for stofferne i tabel 1 i tillægget og er endvidere anvendt på en række andre kemiske stoffer i følgende grupper:

— aromatiske aminer (f.eks. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naphthylamin)

— aromatiske carboxylsyreestere (f.eks. benzoesyremethylester, 3,5-dinitrobenzoesyreethylester)

— aromatiske carbonhydrider (f.eks. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen)

— aryloxyphenoxypropionsyreestere (f.eks. diclofopmethyl, fenoxapropethyl, fenoxaprop-P-ethyl)

— benzimidazol- og imidazol-fungicider (f.eks. carbendazim. fuberidazol, triazoxid)

— carboxylsyreamider (f.eks. 2-chlorbenzamid, N.N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid)

— chlorerede carbonhydrider (f.eks. endosulfan, DDT. hexachlorbenzen, quintozen, 1.2,3-trichlorbenzen)

— insekticider af typen organiske fosforforbindelser (f.eks. azinphosmethyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos. sulprofos, triazophos)

— phenoler (f.eks. phenol, 2-nitrophenol. 4-nitrophenol, pentachlorphenol, 2.4.6-trichlorphenol. 1-naphthol)

— derivater af phenylurinstof (f.eks. isoproturon. monolinuron. pencycuron)

— pigmentfarvestoffer (f.eks. Acid Yellow 219. Basic Blue 41, Direct Red SI)

— polyaromatiske carbonhydrider (f.eks. acenaphthen, naphthalen)

— 1,3,5-triazin-herbicider (f.eks. prometryn, propazin, simazin, terbutryn)

— triazolderivater (f.eks. tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoden er ikke anvendelig til stoffer, som reagerer enten med eluenten eller den stationære fase. Den er ligeledes ikke anvendelig til stoffer, som udviser specifik interaktion med uorganiske komponenter (f.eks. kompleksdannelse med lermineraler). Metoden virker ikke nødvendigvis på overfladeaktive stoffer, uorganiske stoffer og middelstærke til stærke organiske syrer og baser. Log K_{oc}-værdier mellem 1,5 og 5,0 kan bestemmes. Til bestemmelse af ioniserbare stoffer må anvendes en bufret mobil fase, men der må tages forholdsregler til undgåelse af udfældning af bufferkomponenter eller prøvestof.

▼B

1.6. KVALITETSKRITERIER

1.6.1. **Nøjagtighed**

Normalt kan adsorptionskoefficienten af et prøvestof bestemmes inden for +/- 0,5 logaritmeenhed af den tilsvarende værdi bestemt ved batch-ligevægtsmetoden (se tabel 1 i tillægget). Bedre nøjagtighed kan opnås, hvis de anvendte referencestoffer er strukturelt beslægtet med prøvestoffet.

1.6.2. **Repeterbarhed**

Bestemmelserne skal foretages mindst som dobbeltbestemmelser. Log K_{oc}-værdier baseret på enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed indbyrdes.

1.6.3. **Reproducerbarhed**

De hidtidige erfaringer med anvendelsen af metoden underbygger dens validitet, En undersøgelse af HPLC-metoden på 48 stoffer (hovedsagelig pesticider), for hvilke der forelå pålidelige data vedrørende K_{oc} i jord, resulterede i en korrelationskoefficient på R = 0,95 (10)(11).

Der er gennemført en sammenlignende laboratorieundersøgelse med 11 deltagende laboratorier med henblik på at forbedre og validere metoden (12). Resultaterne er gengivet i tabel 2 i tillægget.

1.7. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.7.1. **Indledende skøn over adsorptionskoefficienten**

Oktanol-vand fordelingskoefficienten P_{ow} (= K_{ow}) og, i nogen udstrækning, vandopløseligheden kan — navnlig for uioniserede stoffer — benyttes som indikatorer for adsorptionsgraden og således bruges til indledende afgrænsning af området. Der er udgivet en række nyttige korrelationer for forskellige grupper af kemiske stoffer (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2. **Apparatur**

Der anvendes en væskekromatograf forsynet med en impulsfri pumpe og en egnet detektor. Det anbefales at bruge en injektionsventil med injektionssløjfe. Der anvendes gængse kemisk bundne cyanopropyl-harpikser på silicabasis (f.eks. Hypersil og Zorbax CN). En forkolonne af samme materiale kan placeres mellem injektions-system og analysekolonne. Kolonner fra forskellige leverandører kan variere betydeligt i adskillelsesevne. Vejledende skal man opnå følgende kapacitetsfaktorer k'; log k' > 0,0 for log K_{oc} = 3,0 og log k' > 0,4 for log K_{oc} = 2,0 ved anvendelse af en mobil fase bestående af methanol/vand 55/45 %.

1.7.3. **Mobile faser**

Der er afprøvet forskellige mobile faser, og følgende to anbefales:

— methanol/vand (55/45 % v/v)

— methanol/0,01 M citratbuffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Til fremstilling af elueringsvæsken anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret vand eller citratbuffer. Blandingen afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Er methanol/vand-blandinger ikke egnede, kan andre blandinger af organiske opløsningsmidler og vand anvendes, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand. For ioniserbare stoffer anbefales, at pH stabiliseres med bufferopløsning. Der må træffes foranstaltninger til at undgå saltudfældning og tæring af kolonnen, som kan forekomme ved visse blandinger af organisk fase og buffer.

Der må ikke anvendes additiver som f.eks. ionparreagenser, da de kan påvirke sorptionsegenskaberne af den stationære fase. Sådanne ændringer af den stationære fase kan være irreversible. Af denne grund er det ubetinget nødvendigt, at eventuelle forsøg med additiver udføres på separate kolonner.

1.7.4. **Opløste stoffer**

Prøve- og referencestoffer opløses i den mobile fase.

1.8. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.8.1. **Prøvningsbetingelser**

Temperaturen bør registreres under af målingerne. Det anbefales stærkt, at kolonnerummet er temperaturreguleret for at sikre konstante betingelser under kalibrerings- og overslagsforsøg og måling af prøvestoffet.

1.8.2. **Bestemmelse af dødtid t_0**

Til bestemmelse af dødtiden t_0 kan anvendes to forskellige metoder (se også 1.2).

1.8.2.1. *Bestemmelse af dødtiden t_0 ved hjælp af en homolog serie*

Denne fremgangsmåde har vist sig give pålidelige og ensartede t_0-værdier. Nærmere enkeltheder herom kan findes i prøvemetode A.8: Fordelingskoefficient (n-oktanol/vand), HPLC-metode.

1.8.2.2. *Bestemmelse af dødtid t_0 ved hjælp af inaktive stoffer, som ikke tilbageholdes af kolonnen*

Teknikken bygger på, at der indsprøjtes en opløsning af formamid, urinstof eller natriumnitrat. Bestemmelserne skal udføres mindst som dobbeltbestemmelser.

1.8.3. **Bestemmelse af retentionstider t_R**

Referencestoffer vælges som beskrevet i 1.3. Til bestemmelse af disse stoffers retentionstid kan de indsprøjtes som en blandet standard, forudsat at det er godtgjort, at retentionstiden for den enkelte referencestandard er upåvirket af tilstedeværelsen af de andre referencestandarder. Kalibrering skal ske med regelmæssige intervaller mindst to gange dagligt for at tage højde for eventuelle uventede ændringer i kolonnens præstationer. Det bedste er at udføre kalibreringsindsprøjtningerne før og efter indsprøjtning af prøvestoffet for at bekræfte, at retentionstiderne er uændrede. Prøvestofferne indsprøjtes separat i mindst mulig mængde (undgå overbelastning af kolonnen), og deres retentionstider bestemmes.

▼B

For at gøre målingerne mere pålidelige bør de udføres mindst som dobbeltbestemmelser. Log K_{oc}-værdier afledt af enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed fra hinanden.

1.8.4. **Bedømmelse**

Kapacitetsfaktorerne k' beregnes af dødtiden t_0 og retentionstiderne t_R for de valgte referencestoffer efter ligning 4 (se 1.2). Log k'-værdierne for referencestofferne afbildes derefter mod de tilhørende log K_{oc}-værdier fra batchligevægtsforsøgene, som er givet i tabel 1 og 3 i tillægget. Ved hjælp af denne kurve anvendes log k'-værdien for et prøvestof derefter til beregning af dets K_{oc}-værdi. Viser de faktiske resultater, at log K_{oc} for prøvestoffet er uden for kalibreringsområdet, bør forsøget gentages med et andet, mere velegnet referencestof.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— identitet og renhed af prøve- og referencestof, samt pK_a-værdi hvis relevant

— beskrivelse af apparatur og forsøgsbetingelser, f.eks. type og dimension af analysekolonne (og forkolonne), detektionsmåde, mobil fase (forholdet mellem komponenterne, samt pH), temperaturområde under målingerne

— dødtiden og metoden anvendt til bestemmelse heraf

— mængdeprøve- og referencestof, som indføres i kolonnen

— retentionstiderne for de referencestoffer, der anvendes til kalibrering

— enkeltheder vedrørende den tilnærmede regressionslinje (log k' mod log Koc) og grafisk fremstilling af regressionslinjen

— gennemsnitlig retention og beregnet d log K_{oc}-værdi for prøvestoffet

— kromatogrammer.

HENVISNINGER

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 1 7, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils, Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kordel, W. Klein (1991) Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test, Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Tillæg

Tabel 1

Sammenligning af K_{oc}-værdier for jordarter og kloakslam, samt værdier beregnet ved HPLC-screeningsmetoden (1) (2)

Stof	CAS nr.	kloakslam	Log K_{oc} ved HPLC	Δ	Log K_{oc} for jordtyper	Log K_{oc} ved HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoesyrepheny-lester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroanilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

(1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Tabel 2

Resultater af det laboratoriesammenlignende forsøg (11 deltagende laboratorier), som er gennemført med henblik på at forbedre og validere HPLC-metoden (1)

Stof	CAS nr.	Log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC metode)	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2 062 + 648	3,31

(1) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere. 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Tabel 3

Anbefalede referencestoffer til HPLC-screeningsmetoden baseret på jordadsorptionsdata

Referencestof	CAS nr.	Gennemsnitlige log K_{oc}-værdier fra batchligevægt	Nummer på K_{oc}-data	Log S.D.	Kilde
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N.N-dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[c]
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Methylbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naphthalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Phenanthren	8 5-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 4] (mix)	26850-47-5 12270-13-	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3-2	5,631—	1	—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen. W. Kördel. W. Klein (1991). Chemosphere, 22. pp, 285-304.
[c] Data stillet til rådighed af industrien.

▼M7

C.20. FORMERINGSTEST FOR *DAPHNIA MAGNA*

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 211 (2012). OECD's testvejledning bliver med mellemrum revideret på baggrund af den videnskabelige udvikling. Testvejledning 211 for formeringstest stammer fra retningslinje 202, del II, formeringstest for *Daphnia* sp. (1984). Det var almindelig anerkendt, at data fra test udført i henhold til testvejledning 202 kunne variere. Dette betød, at der blev gjort en stor indsats for at identificere årsagerne til denne variation med henblik på at udarbejde en bedre forsøgsmetode. Testvejledning 211 er baseret på resultaterne af disse undersøgelser, ringtest og valideringsundersøgelser fra 1992 (1), 1994 (2) og 2008 (3).

De vigtigste forskelle mellem første version (TG 202, 1984) og anden version (TG 211, 1998) af testvejledningen for formeringstest er følgende:

— Den anbefalede art til undersøgelser er *Daphnia magna* (stor dafnie).

— Testens varighed er 21 dage.

— I semistatiske test er antallet af dyr til hver testkoncentration blevet reduceret fra mindst 40, fortrinsvis opdelt i fire grupper med 10 dyr, til mindst 10 dyr, der holdes enkeltvis (selv om der kan bruges forskellige modeller til test med gennemstrømning).

— Der er fremsat mere specifikke anbefalinger med hensyn til testmedium og fodring.

— De vigtigste forskelle mellem den anden version af testvejledningen for formeringstest (TG 211, 1998) og denne version er følgende:

— Tillæg 7 er blevet tilføjet for at beskrive procedurer til identifikation af nyfødtes køn, hvis dette kræves. I overensstemmelse med tidligere versioner af denne forsøgsmetode er kønsfordeling et valgfrit endepunkt.

— Responsvariablen antal levende afkom pr. overlevende forældredyr er blevet suppleret med yderligere en responsvariabel for formering af dafnier, dvs. det samlede antal levende afkom ved testens afslutning pr. voksen dafnie ved testens begyndelse, idet utilsigtet dødelighed/dødelighed som følge af fejl blandt forældredyr ikke indgår i analysen. Formålet med den ekstra responsvariabel er at tilpasse denne responsvariabel til andre formeringsforsøgsmetoder vedrørende hvirvelløse dyr. Derudover er det i forbindelse med denne responsvariabel muligt i denne forsøgsmetode at fjerne en fejlkilde, nemlig virkningen af utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældredyr, hvis en sådan forekommer i eksponeringsperioden.

— Yderligere statistiske retningslinjer for udformning af testdesign og behandling af resultater er medtaget for både ECx- (f.eks. EC10 eller EC50) og NOEC/LOEC-tilgangen.

— Der er indført en grænsetest.

De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

Det primære formål med testen er at vurdere kemikaliers indvirkning på *Daphnia magnas* formeringsevne. Unge hundafnier (forældregenerationen), yngre end 24 timer ved testens begyndelse, udsættes for testkemikaliet opløst i vand i en række koncentrationer. Testen varer 21 dage. Ved testens afslutning bedømmes det totale antal levende afkom. Forældregenerationens formeringsevne kan udtrykkes på andre måder (f.eks. antal levende afkom pr. moderdyr pr. dag fra den første dag, hvor afkom blev observeret), men skal rapporteres sammen med det samlede

▼M7

antal levende afkom ved testens afslutning. På grund af den semistatiske tests særlige udformning sammenlignet med andre metoder til test af formering af hvirvelløse dyr er det også muligt at tælle antallet af levende afkom fra hver enkelt forældredyr. I modsætning til andre metoder til test af formering af hvirvelløse dyr betyder dette, at afkom af forældredyr, der dør ved en fejl og/eller utilsigtet i løbet af testperioden, kan udelukkes fra vurderingen af data. Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliets koncentration med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliet, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen. Hvis forældredyret dør under testen, dvs. utilsigtet på grund af forkert behandling eller ved en fejl på grund af en uforklarlig hændelse, der ikke har noget med testkemikaliets virkning at gøre, eller viser sig at være af hankøn, udelukkes replikatet fra analysen (se punkt 51 for flere oplysninger). Testkemikaliets toksiske indvirkning på formeringsevnen er udtrykt som ECx ved at fitte data til en passende model ved ikke-lineær regression for at anslå den koncentration, der ville medføre x % reduktion af formeringsevnen, eller alternativt som NOEC/LOEC-værdien (4). *Test-koncentrationerne bør ligge omkring de laveste af de anvendte effektkoncentrationer (f.eks. EC_{10}), hvilket betyder, at denne værdi er beregnet ved interpolering og ikke ekstrapolering.*

Forældregenerationens overlevelse og tiden indtil den første yngel bør også rapporteres. Andre effekter af kemikaliet på parametre såsom vækst (f.eks. længde) og eventuelt den reelle populationsforøgelse kan også undersøges (se punkt 44).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

Resultater fra test af akut toksicitet (jf. kapitel C.2 i dette bilag: *Daphnia* sp., akut immobilisationstest) udført med *Daphnia magna* kan være nyttig med hensyn til at vælge en passende række testkoncentrationer i formeringstestene. Testkemikaliets vandopløselighed og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet i prøveopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode med dokumenteret genfindingsgrad og kvantificeringsgrænse.

Data for testkemikaliet, som kan være nyttige for at fastslå testbetingelserne, inkluderer strukturformel, stoffets renhed, lysstabilitet, stabilitet i testforløbet, pKa, P_{ow} og resultater af test for spontan bionedbrydelighed (se kapitel C.4 (bestemmelse af »spontan« bionedbrydelighed) og C.29 (spontan bionedbrydelighed — CO_2 i forseglede beholdere) i dette tillæg).

TESTENS GYLDIGHED

Hvis en test skal være gyldig, skal kontrollen/kontrollerne opfylde følgende resultatkrav:

— Forældregenerationens dødelighed (hundafnier) må ikke overstige 20 % ved testens afslutning.

— Det gennemsnitlige antal levende afkom pr. overlevende forældre-hundafnie ved testens afslutning er ≥ 60.

Bemærk: Samme validitetskriterium (20 %) kan bruges for utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældregenerationen til kontrollerne og til hver testkoncentration.

▼M7

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testopløsningerne, bør være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Testkarrene vil almindeligvis være af glas.

Yderligere nødvendigt apparatur kan være følgende:

— iltmålingsapparatur (med mikroelektrode eller andet passende udstyr til måling af opløst ilt i små prøvevolumener)

— egnet apparatur til temperaturregulering

— pH-meter

— apparatur til måling af vands hårdhedsgrad

— apparatur til måling af totalkoncentrationen af organisk kulstof (TOC) i vand eller apparatur til bestemmelse af det kemiske iltbehov (COD)

— passende apparatur til kontrol af lysregime og måling af lysintensitet.

Testorganisme

Den art, der skal benyttes i testen, er *Daphnia magna Straus* ([1]).

En genotypebestemmelse som identifikation af arten vil være at foretrække. Undersøgelser 1) har vist, at formeringsevnen af Klon A (som stammer fra IRCHA i Frankrig) (5) er stabil med hensyn til det relevante validitetskriterium med sit gennemsnit på ≥ 60 levende afkom pr. forældredafnie, der overlever ved de dyrkningsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode. Andre kloner er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafniekulturen opfylder validitetskriterierne for testen.

Ved testens begyndelse bør dyrene være yngre end 24 timer og må ikke være det først udrugede afkom. Dyrene bør hidrøre fra en sund bestand (dvs. fri for tegn på stress som høj dødelighed, tilstedeværelse af hanner og ephippia, forsinket frembringelse af første kuld, misfarvede dyr osv.). De dyr, der siden skal levere forsøgsdyr, skal opdrættes under betingelser (lys, temperatur, medium, fodring og antal dyr pr. volumenenhed) svarende til dem, der anvendes i testen. Hvis dafnierne rutinemæssigt lever i et andet medium end det, der anvendes i testen, er det god praksis at inkludere en akklimatiseringsperiode forud for testen på normalt tre uger (dvs. en generation) for at undgå at stresse forældregenerationen.

Testmedium

Det anbefales at anvende et veldefineret medium i denne test. Derved undgås brugen af additiver (f.eks. tang og udtræk af jord), som er vanskeligt at karakterisere, og derved forbedres muligheden for standardisering laboratorierne imellem. Medierne Elendt M4 (6) og M7 (se tillæg 2) er fundet velegnede til dette formål. Andre medier (f.eks. (7) (8)) er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafniekulturen opfylder validitetskriterierne for testen.

([1]) Andre dafnier kan anvendes, under forudsætning af at de opfylder validitetskriterierne (det relevante validitetskriterium for alle arter er formeringsevnen, som den ses i kontrollerne). Hvis der anvendes andre dafnier, bør de klart defineres og brugen af dem begrundes.

▼M7

Hvis der anvendes medier, som indeholder udefinerede tilsætningsstoffer, skal disse klart specificeres, og der skal fremskaffes oplysninger til testrapporten om sammensætning, særligt med hensyn til kulstofindhold, da det kan optræde som tilskud til foderet. Det anbefales at fastlægge det totale organiske kulstof (TOC) og/eller kemiske iltkrav (COD) til det organiske additiv i stamopløsningen, og at der foretages en vurdering af det medfølgende tilskud til TOC/COD i testmediet. Det anbefales yderligere, at niveauet af TOC i mediet (før tilsætning af alger) er under 2 mg/l (9).

Det er vigtigt at gøre sig klart i forbindelse med undersøgelse af kemikalier, der indeholder metaller, at testmediets egenskaber (f.eks. hårdhed og cheleringskapacitet) kan have indflydelse på testkemikaliets toksicitet. Af den grund er et fuldt ud defineret medium ønskeligt. For tiden er de eneste fuldt ud definerede medier, som er egnede til langtidskulturer med Daphnia magna, Elendt M4 og M7. Begge indeholder EDTA som cheleringsmiddel. Det er blevet påvist (2), at cadmiums »tilsyneladende toksicitet« generelt er lavere, når formeringstesten udføres med M4 og M7 end med medier uden EDTA. Af den grund er M4 og M7 ikke at anbefale, når der skal undersøges kemikalier indeholdende metaller, ligesom andre medier, som er kendt for at indeholde chelerende stoffer, ligeledes bør undgås. Til kemikalier, der indeholder metaller, tilrådes brug af andre medier som f.eks. hårdt ferskvand tilsat ASTM (9), som ikke indeholder EDTA. Denne kombination af hårdt ferskvand tilsat ASTM og algeekstrakt (10) er egnet til langsigtet dyrkning af *Daphnia magna* (2).

Koncentrationen af opløst ilt bør være over 3 mg/l i begyndelsen af og under testen. pH-værdien bør ligge mellem 6 og 9 og bør normalt ikke variere mere end 1,5 enheder pr. test. En hårdhed på over 140 mg/l (målt som $CaCO_3$) anbefales. Test på dette niveau og derover har vist formeringsevne, der er i overensstemmelse med validitetskriterierne (11)(12).

Testopløsninger

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør fortrinsvis fremstilles, om muligt uden brug af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler, ved at blande eller omryste testkemikaliet i testmediet ved mekanisk omrystning, omrøring eller ultralydbehandling. Det er mest hensigtsmæssigt at udsætte testsystemer for de koncentrationer af testkemikaliet, der skal bruges i testen, så længe det er nødvendigt for at dokumentere stabile eksponeringskoncentrationer før indførelsen af testorganismer. Hvis testkemikaliet er vanskeligt at opløse i vand, bør de procedurer, der er beskrevet i OECD's vejledning om håndtering af vanskelige stoffer, følges (13). Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration til dosering.

Ud over testkoncentrationerne bør en fortyndingsvandkontrol og, om nødvendigt, en opløsningsmiddelkontrol med passende replikater køres. Kun opløsningsmidler eller dispergeringsmoder, som påviseligt ikke har betydelig eller kun minimal indvirkning på responsvariablen, bør anvendes i testen. Eksempler på egnede opløsningsmidler (f.eks. acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol) og dispergeringsmidler (f.eks. Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % og HCO-40) findes i (13). Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration ikke overstige 0,1 ml/l (13), og

▼M7

der bør være samme koncentration i alle testbeholdere, bortset fra ved fortyndingsvandkontrollen. Det bør dog tilstræbes at holde koncentrationen af opløsningsmiddel på et minimum.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Varighed

Testen varer 21 dage.

Belastning

Forældredyrene holdes individuelt, et pr. testbeholder, sædvanligvis med 50-100 ml medium (for *Daphnia magna* er mindre mængder en mulighed, især for mindre dafnier såsom *Ceriodaphnia dubia*) i hver beholder, medmindre der er behov for et gennemstrømningstestdesign til testen.

Af hensyn til målinger af koncentrationen af testkemikaliet kan større volumener være nødvendige for at opfylde kravene til analyseproceduren; det er dog tilladt at foretage den kemiske analyse på en pulje af replikater. Hvis der anvendes større mængder end 100 ml, kan det være nødvendigt at øge fødemængden for at sikre, at dafnierne har nok foder, og sikre overensstemmelse med validitetskriterierne.

Forsøgsdyr

Ved semistatiske test skal der være mindst 10 dyr, hver holdt separat, for hver testkoncentration og mindst 10 dyr, hver holdt separat, i kontrolserien.

Det har ved gennemstrømningstest vist sig passende med 40 dyr opdelt i grupper med 10 dyr for hver testkoncentration (1). Man kan anvende et mindre antal testorganismer, og der anbefales da et minimum på 20 dyr pr. koncentration opdelt i to eller flere replikater med et tilsvarende antal dyr (f.eks. fire replikater med hver fem dafnier). Det skal bemærkes, at ved test, hvor dyrene holdes gruppevis, vil det ikke være muligt at udelukke afkom fra den statistiske analyse, hvis der forekommer utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældredyrene, efter at formeringen er påbegyndt, og i disse tilfælde bør formeringsevnen derfor udtrykkes som det totale antal levende afkom pr. forældredyr, der er til stede ved testens begyndelse.

Tilsætning til testbeholderne og de efterfølgende håndteringer af dem bør foretages på en randomiseret måde. Hvis dette ikke gøres, risikerer man systematiske fejl, der kan opfattes som en koncentrationsrelateret virkning. Hvis undersøgelsesenheder håndteres efter behandling eller koncentration, kan en vis tidsrelateret virkning, som f.eks. persontræthed eller anden fejlmulighed, få større effekt ved de højere koncentrationer. Hvis testresultaterne desuden kan tænkes at være påvirket af begivenheder ved testens start eller af omgivelserne, som f.eks. beholdernes placering i laboratoriet, bør man overveje at dele testen op i grupper.

Fodring

I semistatiske test bør fordring foretages dagligt eller mindst tre gange ugentligt (dvs. svarende til udskiftning af medium). Der bør tages hensyn til eventuel fortynding af eksponeringskoncentrationerne på grund af tilsætning af foder. Dette bør i videst muligt omfang undgås ved hjælp af koncentrerede algesuspensioner. Afvigelser fra dette (f.eks. ved gennemstrømningstest) skal rapporteres.

Under testen bør forældredyr fortrinsvis fodres med levende algeceller af en eller flere af følgende: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (tidligere *Selenastrum capricornutum*) og *Desmodesmus subspicatus* (tidligere *Scenedesmus subspicatus*). Det tilførte foder bør baseres på mængden af organisk kulstof (C)

▼M7

for hvert forældredyr. Undersøgelser (14) har vist, at det for *Daphnia magna* er tilstrækkeligt med fodermængder i størrelsesordenen 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn for at opnå det krævede antal levende afkom og opfylde validitetskriterierne. Fodermængden kan enten gives med en konstant frekvens gennem hele forsøgsperioden, eller der kan eventuelt gives en lavere mængde til at begynde med, som så efterfølgende kan forøges i løbet af testen for at tage hensyn til forældredyrenes vækst. I så fald bør fodermængden i hele perioden stadig ligge inden for de anbefalede mængder på 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn.

Hvis erstatningsmålinger, som f.eks. antal algeceller eller lysabsorption anvendes (for nemheds skyld, da måling af kulstofindhold er tidskrævende), bør hvert laboratorium fremstille et nomogram, som sammenholder erstatningsmålingen med kulstofindholdet i algekulturen (se tillæg 3 for rådgivning om konstruktion af nomogram). Nomogrammer bør kontrolleres mindst en gang årligt og hyppigere, hvis betingelserne for algedyrkningen har ændret sig. Det er påvist, at lysabsorption er en bedre erstatning end celletælling til beregning af kulstofindhold (15).

Man bør tilføre dafnierne algesuspensionen i koncentreret form, således at mindst muligt af algedyrkningsmediet overføres til forsøgskarrene. Opkoncentrering af alger kan foretages ved centrifugering efterfulgt af resuspension i dafniedyrkningsmedium.

Lys

16 timers lys med en intensitet, der ikke overstiger 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ målt ved beholderens vandoverflade. For lysmåleinstrumenter kalibreret i lux svarer en tilsvarende lysintensitet på 1 000-1 500 lux med cool white-lys til den anbefalede lysintensitet på 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Temperatur

Testmediets temperatur skal ligge på mellem 18 og 22 °C. I det enkelte forsøg bør temperaturen om muligt dog ikke variere mere end 2 °C dagligt (f.eks. 18-20, 19-21 eller 20-22 °C). Det kan være hensigtsmæssigt at anvende en testbeholder mere til brug for overvågning af temperaturen.

Gennemluftning

Testbeholderne må ikke gennemluftes under testen.

Testdesign

Forprøve til bestemmelse af intervaller

Når det er nødvendigt, udføres der en forprøve for at bestemme dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer og to replikater for hver behandling og kontrol. Yderligere oplysninger fra test med lignende kemikalier eller fra litteraturen om akut toksicitet for dafnier og/eller andre organismer, der lever i vand, kan også være nyttige for fastlæggelsen af de koncentrationsintervaller, der skal anvendes til forprøven.

Forprøvens varighed er 21 dage eller tilstrækkelig lang til, at virkninger kan forudsiges pålideligt. Ved testens afslutning vurderes dafniernes reproduktion. Antallet af forældredyr og forekomsten af afkom bør registreres.

Endelig test

Normalt bør der være mindst fem testkoncentrationer omkring effektiv koncentration (f.eks. EC_X) arrangeret i en geometrisk række med en adskillelsesfaktor, som ikke bør overstige 3,2, og der bør bruges et passende antal replikater for hver testkoncentration (se punkt 24-25). Det bør begrundes, hvis der bruges under fem koncentrationer. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der

▼M7

overstiger deres opløselighed i testmedium. Før et forsøg anbefales det at overveje testmodellens statistiske power og benytte passende statistiske metoder (4). I fastlæggelsen af koncentrationsintervallet bør følgende tages i betragtning:

i) Når EC_X for indvirkning på formeringsevnen anslås, er det tilrådeligt at anvende tilstrækkeligt mange koncentrationer til, at EC_X kan defineres med passende sikkerhed. De anvendte testkoncentrationer bør fortrinsvis ligge omkring den anslåede EC_X-værdi, således at EC_X findes ved interpolering og ikke ekstrapolering. Det vil være hensigtsmæssigt med flere testkoncentrationer i den efterfølgende statistiske analyse (f.eks. 10) og færre replikater af hver koncentration (f.eks. 5, således at det samlede antal beholdere holdes konstant) samt 10 kontroller.

ii) Når LOEC og/eller NOEC anslås, bør den laveste testkoncentration være så lav, at formeringsevnen ved denne koncentration ikke er betydeligt lavere end i kontrollen. Hvis det ikke er tilfældet, bør testen gentages med en mindre laveste koncentration.

iii) Når LOEC og/eller NOEC anslås, bør den højeste testkoncentration være så høj, at formeringsevnen ved denne koncentration er signifikant lavere end i kontrollen. Hvis dette ikke er tilfældet, bør testen gentages med en højere højeste koncentration, medmindre der er anvendt den maksimale krævede koncentration til test af kroniske virkninger (dvs. 10 mg/l) som højeste testkoncentration i forprøven.

Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i forprøven (f.eks. ved 10 mg/l), eller når det er meget sandsynligt, at testkemikaliet har lav/ingen toksicitet på basis af manglende toksicitet for andre organismer og/eller ringe eller ingen optagelse, kan formeringstesten gennemføres som en grænsetest, hvor der anvendes en testkoncentration på f.eks. 10 mg/l. Der bruges 10 replikater til både behandlings- og kontrolgruppen. Når det kan blive nødvendigt at foretage en grænsetest i et gennemstrømningssystem, kan antallet af replikater reduceres. Med en grænsetest kan det påvises, at der ikke er nogen statistisk signifikant virkning ved grænsekoncentrationen, men hvis der registreres virkninger, vil det normalt være nødvendigt med en komplet undersøgelse.

Kontroller

Foruden testserien bør der gennemføres en kontrolserie med testmedium og, hvis det er relevant, en kontrolserie med opløsnings- eller dispergeringsmiddel. Hvis der bruges opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør koncentrationen være den samme som koncentrationen i beholderne med testkemikaliet. Der bør anvendes et passende antal replikater (se punkt 23-24).

Almindeligvis vil variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal afkom pr. forældredyr i kontrollen/kontrollerne i en vellykket test være $\leq$ 25 %, og dette skal rapporteres for testdesign, hvor dyrene har været holdt hver for sig.

Fornyelse af testmedium

Hvor ofte mediet fornys, afhænger af testkemikaliets stabilitet, men det bør ske mindst tre gange om ugen. Hvis man fra tidligere stabilitetstest (se punkt 7) ved, at koncentrationen af testkemikaliet ikke er stabil (dvs. uden for 80-120 % af den nominelle koncentration eller falder til under 80 % af den målte koncentration i forprøven) i løbet af den maksimale fornyelsesperiode (dvs. tre døgn), bør man overveje at skifte mediet hyppigere eller at gå over til en gennemstrømningstest.

▼M7

Når mediet fornys i semistatiske test, gøres en anden række af testkar klar, og forældredyrene flyttes derover, f.eks. ved hjælp af en glaspipette med en passende diameter. Der bør overføres mindst muligt medium sammen med dafnierne.

Observationer

Resultaterne af de observationer, der er foretaget under testen, bør registreres i dataark (se eksempler i tillæg 4 og 5). Hvis der ønskes andre målinger (se punkt 44), kan det være nødvendigt med flere observationer.

Afkom

Det er bedst dagligt at fjerne og tælle afkom fra hvert forældredyr fra første dag, der ses yngel, for at hindre ynglen i at indtage den føde, der er tiltænkt forældredyret. I denne forsøgsmetode tælles kun antal levende afkom, men tilstedeværelsen af aborterede æg eller dødt afkom bør også registreres.

Dødelighed

Dødeligheden blandt forældredyrene bør noteres dagligt og mindst fald lige så ofte, som afkommet tælles.

Andre parametre

Selv om denne forsøgsmetode primært er udformet til at vurdere virkninger på formeringsevnen, kan andre virkninger også kvantificeres i tilstrækkelig grad til, at der kan fortages statistiske beregninger. Det samlede antal afkom pr. overlevende forældredyr, dvs. antal levende afkom fra testen pr. overlevende forældredyr, kan registreres. Dette kan sammenlignes med den vigtigste responsvariabel (antal afkom pr. forældredyr ved testens begyndelse, der ikke ved en fejl eller utilsigtet døde i løbet af testen). Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliets koncentration med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliet, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen af testresultaterne. Det er yderst ønskeligt at foretage vækstmålinger, da de giver oplysninger om mulige subletale virkninger, som kan være nyttige som supplement til målinger af reproduktion. Det anbefales at måle forældredyrenes længde (dvs. kropslængden minus den anale spina) ved forsøgets afslutning. Andre parametre kan måles eller beregnes såsom tiden til fremkomst af den første yngel (og efterfølgende yngel), antal under pr. dyr og deres størrelse, antal aborterede afkom, tilstedeværelse af nyfødte handyr (OECD, 2008) eller ephippier og muligvis den egentlige populationsstigning (se tillæg 1 for definition og tillæg 7 for identifikation af nyfødtes køn).

Hyppighed af analyser og målinger

Iltkoncentration, temperatur, hårdhedsgrad og pH-værdier bør som minimum måles hver uge i nye og gamle medier, i kontroller og i opløsninger med den højeste koncentration af testkemikaliet.

Mens forsøget løber, måles koncentrationen af testkemikaliet med regelmæssige intervaller.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af testkemikaliet forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration (dvs. inden for 80-120 %, se punkt 6 og 7), anbefales det som et minimum at måle højeste og laveste testkoncentration ved fremstillingen og i forbindelse med udskiftning en gang i den

▼M7

første testuge (dvs. at analyser bør udføres på en prøve fra samme opløsning — nyfremstillet og ved udskiftning). Disse målinger bør efterfølgende gentages mindst en gang om ugen.

I forbindelse med test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle testkoncentrationer, når de er nyfremstillede og ved udskiftning. I de test, hvor testkemikaliets målte koncentration ved start ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, men hvor der er tilstrækkelig dokumentation for, at koncentrationerne ved start kan gentages og er stabile (dvs. inden for 80-120 % af startkoncentrationerne), kan kemiske målinger i testens anden og tredje uge reduceres til den højeste og den laveste testkoncentration. I alle tilfælde skal testkemikaliets koncentration før udskiftning kun bestemmes for en replikatbeholder for hver testkoncentration.

Anvendes der en gennemstrømningstest, er et analysesystem svarende til det, der er beskrevet for semistatiske test, hensigtsmæssigt (men i dette tilfælde måles »gamle« opløsninger ikke). I den første uge kan det være tilrådeligt at øge antallet af prøveudtagninger (f.eks. tre hold målinger) for at sikre, at testkoncentrationerne holder sig stabile. I den type test bør gennemstrømningshastigheden for fortyndingsvæske og testkemikalie kontrolleres dagligt.

Hvis det kan konstateres, at koncentrationen af det kemikalie, der skal testes, har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Hvis afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration er større end ± 20 %, bør resultaterne udtrykkes som tidsvægtet gennemsnit (se vejledning om beregning i tillæg 6).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på formeringsevnen. Det totale antal levende afkom pr. forældredyr bør beregnes for hver beholder (dvs. hver replikat). Desuden kan formeringen beregnes på grundlag af levende afkom efter den overlevende forældreorganisme. Men den økologisk mest relevante responsvariabel er det samlede antal levende afkom pr. forældredyr, som ikke dør ved en fejl ([1]) eller utilsigtet ([2]) under testen. Hvis forældredyret dør utilsigtet eller ved en fejl under forsøget eller viser sig at være af hankøn, udelukkes replikatet fra analysen. Analysen vil så blive baseret på et reduceret antal replikater. Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliets koncentration med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliet, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen af testresultaterne.

Når LOEC og NOEC eller ECx bruges til at udtrykke virkningerne, anbefales det at beregne virkningen på formering ved hjælp af begge ovennævnte responsvariabler, dvs.

([1]) Dødelighed ved en fejl: ikke kemikalierelateret dødelighed forårsaget af en utilsigtet hændelse (dvs. kendt årsag).

([2]) Utilsigtet dødelighed: ikke kemikalierelateret dødelighed uden kendt årsag.

▼M7

— som det samlede antal levende afkom pr. forældredyr, der ikke dør utilsigtet eller ved en fejl under testen, og

— som antal levende afkom pr. overlevende forældredyr,

og derefter som det endelige resultat bruge den laveste NOEC- og LOEC- eller ECx -værdi, der beregnes ved hjælp af en af disse to responsvariabler.

Før den statistiske analyse anvendes, f.eks. ANOVA-procedurer, sammenholdelse af behandlinger og kontroller ved hjælp af Student t-test, Dunnetts test, Williams' test eller stepdown Jonckheere-Terpstra test, anbefales det at overveje at transformere data for at opfylde kravene i den pågældende statistiske test. Som ikke-parametriske alternativer kan Dunns eller Mann-Whitneys test overvejes. Der beregnes 95 % konfidensintervaller for de enkelte behandlingers middelværdier.

Antallet af overlevende hunner i de ubehandlede kontroller er et validitetskriterium og bør dokumenteres og rapporteres. Andre skadelige virkninger, f.eks. unormal adfærd og betydelige toksikologiske resultater, bør også anføres i den endelige rapport.

ECx

ECx-værdier, herunder de dermed associerede øvre og nedre konfidensgrænser, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Karber-metoden eller simpel interpolering). For at beregne EC10, EC_{50} eller enhver anden ECx-værdi underkastes det komplette datasæt en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

Hvis en statistisk analyse skal bruges til at bestemme NOEC/LOEC, bør der anvendes passende statistiske metoder i overensstemmelse med OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application(4). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrollerne ved hjælp af en ensidet hypotesetest ved $p \leq 0,05$.

Normalfordeling og varianshomogenitet kan testes ved hjælp af en passende statistisk test, f.eks. Shapiro-Wilk og Levene test ($p \leq 0,05$). Der kan foretages en envejs-ANOVA-test og efterfølgende multisammenligningstest. Multisammenligninger (f.eks. Dunnetts test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test eller en step-down Jonckheere-Terpstra-test) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Guidance Document 54 (4)). Alternativt kan ikke-parametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstras trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet og homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). En t-test med ulige varians (Welch t-test) eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.

For at fastslå, om der er signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddel-/dispergeringsmiddelkontrol), kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrol og opløsningsmiddelkontrol pooles. I modsat fald bør alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

▼M7

Testrapport

Testrapporten indeholder følgende:

Testkemikalie:

— fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identifikationsdata, herunder renhed.

Testart:

— klonen (om den er genotypebestemt), leverandør eller kilde (hvis kendt) og de anvendte dyrkningsbetingelser. Hvis en anden art end *Daphnia magna* anvendes, anføres og begrundes dette.

Testbetingelser:

— den anvendte testprocedure (f.eks. semistatisk eller gennemstrømning, volumen, antal dafnier pr. liter)

— lysperiode og lysintensitet

— testdesign (f.eks. antal replikater, antal forældredyr pr. replikat)

— oplysninger om anvendt dyrkningsmedium

— eventuel tilsætning af organisk materiale, herunder sammensætning, kilde, fremstillingsmetode, stamopløsningers TOC/COD, vurdering af resulterende TOC/COD i testmediet

— detaljeret information om fodring, herunder mængde (i mg C/dafnie/døgn) og plan (f.eks. fodertype(r)), herunder algernes specifikke navn (art) og, hvis kendt, stamme og dyrkningsbetingelser

— metode til fremstilling af stamopløsninger og hyppighed af fornyelse (evt. opløsningsmiddel eller dispergeringsmiddel og koncentration heraf bør opgives).

Resultater:

— resultater fra eventuelle forprøver vedrørende testkemikaliets stabilitet

— de nominelle testkoncentrationer og resultatet af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i testbeholderne (se eksempel på dataark i tillæg 5); metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænsen bør også rapporteres

— kvaliteten af vandet i testbeholderne (dvs. pH, temperatur, koncentration af opløst ilt og TOC og/eller COD samt hårdhedsgrad, hvor dette er relevant) (se eksempler på dataark i tillæg 4)

— komplet fortegnelse over levende afkom under testen efter hvert forældredyr (se eksempler på dataark i tillæg 4)

— antal døde forældredyr og dagen for hændelsen (se eksempler på dataark i tillæg 4)

— variationskoefficienten for kontrol af formeringsevne (baseret på det totale antal afkom pr. forældredyr, som er i live ved testens afslutning)

— det samlede antal levende afkom pr. forældredyr i hvert replikat bortset fra forældredyr, som kan være døde ved utilsigtet hændelse eller fejl i løbet af testen, plottet mod teststoffets koncentration

▼M7

— hvor det er relevant, det samlede antal levende afkom pr. levende forældredyr i hvert replikat plottet mod testkemikaliets koncentration

— hvor det er relevant, den laveste koncentration med observeret virkning (LOEC) med hensyn til formering, herunder en beskrivelse af de anvendte statistiske fremgangsmåder og en angivelse af, hvilken størrelse effekt der kan forventes påvist (der kan foretages en poweranalyse før forsøgets start) og koncentrationen uden observeret virkning (NOEC) med hensyn til formering; oplysninger om hvilken responsvariabel, der er anvendt til beregning af LOEC- og NOEC-værdien (enten som samlet antal levende afkom pr. moderorganisme, der ikke er død utilsigtet eller ved en fejl under forsøget, eller som det samlede antal levende afkom pr. overlevende moderorganisme); hvor det er relevant, rapporteres LOEC eller NOEC også for forældredyrenes dødelighed.

— hvor det er relevant, EC_x for formering og konfidensintervaller (f.eks. 90 eller 95 %) og en graf over den model, der er anvendt til beregningen, hældningen på koncentration/respons-kurven og standardfejlen

— andre observerede biologiske virkninger eller målinger. Der anføres enhver biologisk virkning, som er observeret eller målt (f.eks. forældredyrenes vækst), herunder relevante begrundelser

— en redegørelse for enhver afvigelse fra forsøgsmetoden.

LITTERATUR

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. I: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. I: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne forsøgsmetode anvendes følgende definitioner:

Dødelighed ved en fejl: Ikke kemikalierelateret dødelighed forårsaget af en utilsigtet hændelse (dvs. kendt årsag).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

EC_X: Den koncentration af testkemikaliet opløst i vand, som resulterer i en x procent reduktion i formeringsevne for *Daphnia magna* inden for en fastlagt eksponeringstid.

Utilsigtet dødelighed: Ikke kemikalierelateret dødelighed uden kendt årsag.

Reel populationsforøgelse: Mål for vækst, der integrerer formeringsevne og aldersbetinget dødelighed (1)(2)(3). I en ligevægtspopulation vil den være lig nul. For populationer i vækst vil den være positiv, og for populationer i nedgang vil den være negativ. Det er klart, at den sidste situation er uholdbar og vil ende med populationens udslettelse.

Detektionsgrænse: Den laveste koncentration, der observeres, men som ikke kan kvantificeres.

Bestemmelsesgrænse: Den laveste koncentration, der kan måles kvantitativt.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC): Den laveste kemikaliekoncentration, der i testen har vist sig at have en statistisk signifikant indflydelse ($p < 0,05$) på formering og forældredyrs dødelighed inden for den fastlagte eksponeringstid, sammenlignet med kontrollen. Imidlertid burde alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der på en fyldestgørende måde redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Dødelighed: Et dyr registreres som dødt, når det ikke bevæger sig, dvs. når det ikke er i stand til at svømme, eller hvis der ikke ses bevægelser af vedhæng eller postabdomen inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af testbeholderen. (Benyttes en anden definition, bør dette angives tillige med den tilhørende henvisning).

Koncentration uden observeret effekt (NOEC): Den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en fastlagt eksponeringstid.

Afkom: Unge dafnier, der er født af forældredyr under testen.

Forældredyr: Hundafnier, som er til stede ved testens begyndelse, og hvis formeringsevne er genstand for undersøgelse.

Formeringsevne: Antal levende afkom pr. forældredyr inden for testperioden.

Testkemikalie: Et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1997). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Tillæg 2

KOMPLET FREMSTILLING AF MEDIERNE ELENDT M7 OG M4

Akklimatisering til medierne Elendt M7 og M4

Nogle laboratorier har haft problemer med at overflytte dafnier direkte til M4- (1) og M7-mediet. Dog har der været en vis succes med gradvis akklimatisering, dvs. flytning fra eget medium til 30 % Elendt efterfulgt af 60 % Elendt og derefter 100 % Elendt. En akklimatiseringsperiode på helt op til en måned kan være nødvendig.

Fremstilling

Sporstoffer

Først fremstilles separate stamopløsninger (I) af hvert mikronæringsstof i vand af passende renhed, f.eks. deioniseret eller destilleret vand eller vand behandlet ved omvendt osmose. Af disse forskellige stamopløsninger fremstilles I) en enkelt stamopløsning II) indeholdende alle mikronæringsstoffer (kombineret opløsning), dvs.:

Stamopløsning(er) I (et enkelt stof)	Mængde tilsat til vand	Koncentration (i forhold til M4-medium)	Til fremstilling af den kombinerede stamopløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-fold	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-fold	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-fold	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-fold	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-fold	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-fold	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-fold	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-fold	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-fold	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-fold	1,0	1,0
KI	65	20 000-fold	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-fold	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-fold	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-fold	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-fold	—	—
De to opløsninger af Na_2EDTA og $FeSO_4$ fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks. Derved fås:				
Fe-EDTA-opløsning		1 000-fold	20,0	5,0

▼**M7**

M4- og M7-medium

M4- og M7-medierne fremstilles af stamopløsning II, makronæringsstoffer og vitaminer på følgende måde:

	Mængde tilsat til vand	Koncentration (i forhold til M4-medium)	Mængde stamopløsning tilsat til fremstilling af mediet	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Stamopløsning II (kombinerede sporstoffer)		20-fold	50	50
Stamopløsninger af makronæringsstoffer (enkelt stof)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-fold	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-fold	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-fold	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-fold	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-fold	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-fold	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-fold	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-fold	0,1	0,1
Kombineret vitamin-stamopløsning	-	10 000-fold	0,1	0,1

Den kombinerede vitamin-stamopløsning fremstilles ved tilsætning af de tre vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:

	mg/l			
Thiaminhydrochlorid	750	10 000-fold		
Cyanocobalamin (B_{12})	10	10 000-fold		
Biotin	7,5	10 000-fold		

Den kombinerede vitamin-stamopløsning opbevares nedfrosset i små alikvoter. Vitaminerne tilsættes mediet kort før brug.

Bemærk: For at undgå udfældning af salte, når det fuldstændige medium fremstilles, tilsættes de enkelte opløsninger til 500-800 ml deioniseret vand, hvorefter der ihældes op til 1 liter.

Bemærk: Den første publicerede beskrivelse af M4-mediet kan findes i Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-

▼M7

Tillæg 3

ANALYSE AF DET TOTALE ORGANISKE KULSTOF (TOC) OG FREMSTILLING AF NOMOGRAM TIL TOC-INDHOLDET I ALGEFODERET

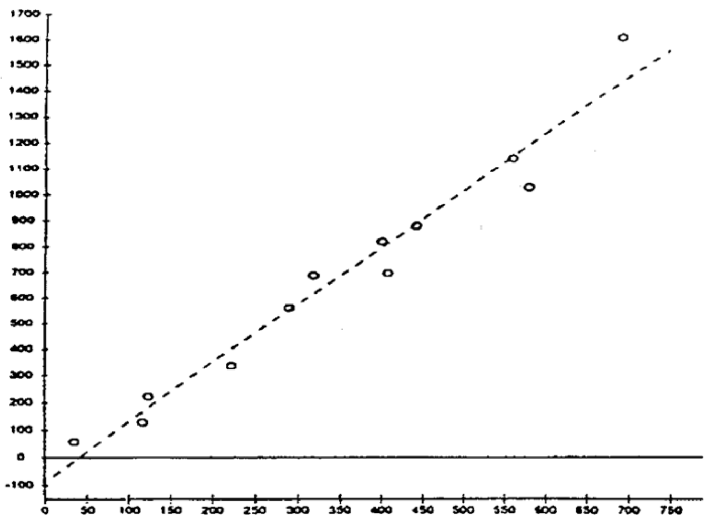
Det erkendes, at kulstofindholdet i algefoderet almindeligvis ikke vil blive målt direkte, men ud fra korrelationer (dvs. nomogrammer med erstatningsmålinger, såsom antallet af algeceller eller lysabsorbans).

TOC bør måles ved oxidering ved høje temperaturer og ikke ved UV- eller persulfatmetoder. (Uddybende oplysninger findes i: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Med henblik på fremstilling af nomogrammer separeres algerne fra dyrkningsmediet ved centrifugering med efterfølgende resuspension i destilleret vand. Erstatningsparameteren og TOC-koncentrationen måles i hver prøve som en tredobbelt bestemmelse. Blindværdier måles i destilleret vand, og TOC-koncentrationen trækkes fra TOC-værdien i algeprøven.

Nomogrammerne skal være lineære i hele området over kulkoncentrationer. Eksempler ses nedenfor:

Bemærk: Disse bør ikke bruges til konvertering; det er essentielt, at laboratorierne selv fremstiller deres egne nomogrammer.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

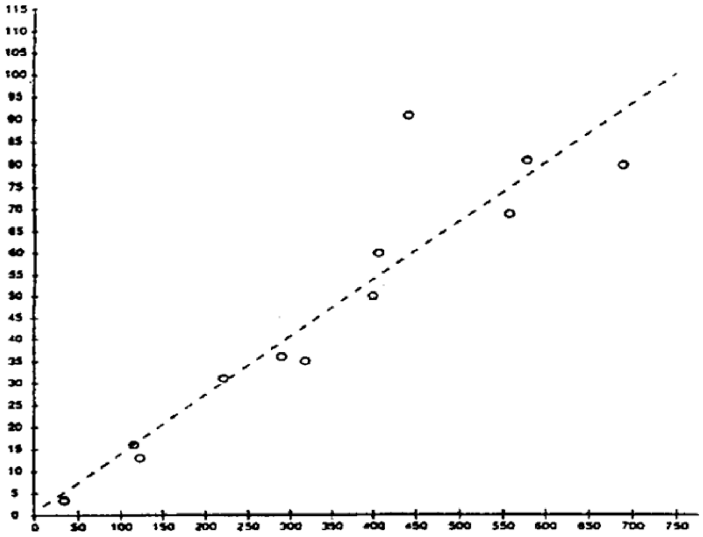
Regression af mg/l tørvægt på mg C/1. Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslæmmes i destilleret vand.

x-akse: mg C/1 af koncentreret algefoder

y-akse: mg/1 tørvægt af koncentreret algefoder

Korrektionskoefficient -0,980

▼**M7**



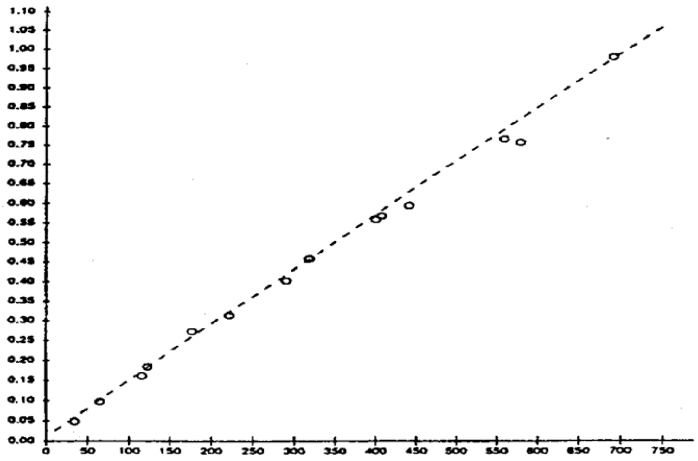
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regression af celleantal på mg C/1. Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslæmmes i destilleret vand.

x-akse: mg C/1 af koncentreret algefoder

y-akse: antal celler/1 af koncentreret algefoder

korrektionskoefficient -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regression af absorbans på mg C/1 (1 cm stilængde). Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslæmmes i destilleret vand.

x-akse: mg C/1 af koncentreret algefoder

y-akse: Absorbansen ved 440 nm af en 1/10-fortynding af koncentreret algefoder

Korrektionskoefficient – 0,998

▼M7

Tillæg 4

EKSEMPEL PÅ DATAARK TIL NOTATER OM UDSKIFTNING AF MEDIUM, FYSISK/KEMISK MONITORERING, FODRING, FORMERING OG DØDELIGHED BLANDT FORÆLDREDYR

Forsøg nr.:	Startdato:						Klon:			Medium:				Type foder:				Testkemikalie:					Nominel konc.:	
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Udskiftning af testmedium (sæt kryds)																								
pH (*)																							ny	
																							gammel	
O_2 (mg/l) (*)																							ny	
																							gammel	
Temp. (°C) (*)																							ny	
																							gammel	
Foder (sæt kryds)																								
Antal levende afkom (**)																								I alt
Beholder 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Forsøg nr.:	Startdato:						Klon:			Medium:				Type foder:				Testkemikalie:					Nominel konc.:	
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							I alt	
Kumulativ dødelighed for forældredyr (***)																								

(*) Angiv, hvilken beholder der er anvendt til forsøget
(**) Registrer aborteret yngel som »AB« i den relevante rubrik
(***) Registrer forældredyrs dødelighed som »M« i den relevante rubrik

▼**M7**

Tillæg 5

EKSEMPEL PÅ DATAARK MED RESULTATER AF KEMISKE ANALYSER

a) **Målte koncentrationer**

Nominel konc.	Prøve i uge 1		Prøve i uge 2		Prøve i uge 3	
	ny	gammel	ny	gammel	ny	gammel

b) **Målte koncentrationer i procent af nominel konc.**

Nominel konc.	Prøve i uge 1		Prøve i uge 2		Prøve i uge 3	
	ny	gammel	ny	gammel	ny	gammel

▼M7

Tillæg 6

BEREGNING AF TIDSVÆGTET GENNEMSNIT

Tidsvægtet gennemsnit

Da koncentrationen af testkemikaliet kan falde i perioden mellem udskiftningerne af mediet, er det nødvendigt at overveje, hvilken koncentration der skal vælges som repræsentant for variationen af koncentrationer, som den voksne dafnie bliver udsat for. Valget bør baseres på såvel biologiske som statistiske betragtninger. Hvis formeringen for eksempel formodes mest påvirket af den højeste koncentration, anvendes denne. Hvis den akkumulerede virkning eller langtidsvirkningen af det toksiske kemikalie imidlertid anses for mere vigtig, er gennemsnitskoncentrationen mere relevant. I dette tilfælde er det hensigtsmæssigt at anvende den tidsvægtede gennemsnitskoncentration, eftersom der her er taget hensyn til variationen i baggrundskoncentration over tid.

Figur 1

Eksempel på tidsvægtet gennemsnit

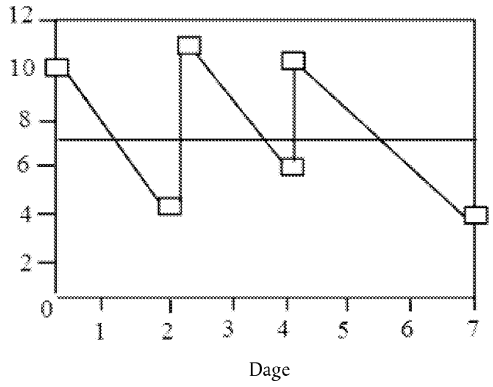


Fig. 1 viser et eksempel på et (forenklet) forsøg over syv dage med udskiftning af mediet på dag 0, 2 og 4.

— Den tynde zigzaglinje repræsenterer koncentrationen på ethvert tidspunkt. Faldet i koncentration formodes at følge en eksponential henfaldsproces.

— De seks angivne punkter repræsenterer de målte koncentrationer ved begyndelsen og slutningen af hver udskiftningsperiode.

— Den tykke, solide linje angiver placeringen af det tidsvægtede gennemsnit.

Det tidsvægtede gennemsnit er beregnet, så arealet under det tidsvægtede gennemsnit har samme størrelse som arealet under koncentrationskurven. Beregningen af det ovenfor viste eksempel ses i tabel 1.

Tabel 1

Beregning af tidsvægtet gennemsnit

Udskiftning Antal	Dage	Conc 0	Conc 0	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Areal
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Udskiftning Antal	Dage	Conc 0	Conc 0	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Areal
Antal dage i alt	7				Areal i alt:	50,092
					Tidsvægtet gennemsnit:	7,156

Dage er antallet af dage i udskiftningsperioden.

Conc 0 er den målte koncentration ved begyndelsen af hver udskiftningsperiode.

Conc 1 er den målte koncentration ved slutningen af hver udskiftningsperiode.

Ln(Conc 0) er den naturlige logaritme til Conc 0.

Ln(Conc 1) er den naturlige logaritme til Conc 1.

Arealet er arealet under eksponentialkurven for hver udskiftningsperiode. Det beregnes således:

$$Areal = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Dag$$

Det tidsvægtede gennemsnit er det *totale areal* divideret med det *totale antal dage*.

Tabellen vil selvfølgelig skulle forlænges til 21 dage i forbindelse med dafnie-formeringstesten.

Det er klart, at når der kun foretages målinger ved begyndelsen og slutningen af hver udskiftningsperiode, kan man ikke bekræfte, at henfaldsprocessen er eksponentiel. En anderledes kurve ville resultere i en anderledes beregning for *arealet*. En eksponential henfaldsproces er dog ikke usandsynlig, og det er den bedste kurve at anvende, når der ikke foreligger andre oplysninger.

Der må dog udvises stor omhu, hvis en kemisk analyse ikke kan påvise et testkemikalie ved afslutningen af udskiftningsperioden. Medmindre man kan påvise, med hvilken hastighed testkemikaliet forsvandt fra opløsningen, er det ikke muligt at finde frem til et realistisk areal under kurven, hvilket medfører, at det er umuligt at finde frem til et rimeligt tidsvægtet gennemsnit.

▼M7

Tillæg 7

VEJLEDNING TIL IDENTIFIKATION AF NYFØDTES KØN

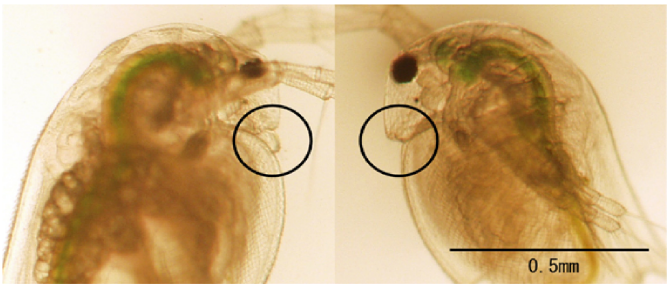
Produktion af nyfødte hanner kan forekomme under skiftende miljøforhold, f.eks. ved forkortet lysperiode, temperaturændring, faldende foderkoncentration og øget populationstæthed (Hobæk og Larson, 1990, Kleiven et al. 1992). Produktion af hanner er også en kendt respons på visse midler til regulering af insektvækst (Oda et al., 2005). Under forhold, hvor kemiske stressfaktorer medfører en nedgang i antallet af formeringsdygtigt afkom fra parthenogenetiske hunner, ville man forvente et stigende antal hanner (OECD, 2008). På grundlag af de foreliggende oplysninger er det ikke muligt at forudsige, hvad der er mest følsomt, kønsfordelingen eller reproduktionsendepunktet. Der er dog indikationer (se del 1 i valideringsrapporten) for, at denne stigning i antallet af hanner kan være mindre følsom end nedgangen i afkom. Da det primære formål med forsøgsmetoden er at vurdere antallet af afkom, er forekomsten af hanner en valgfri observation. Hvis dette valgfri endepunkt evalueres i en undersøgelse, bør et supplerende validitetskriterium i testen være højst 5 % hanner.

Den mest praktiske og letteste måde at inddele dafnierne efter køn på er at bruge deres fænotypiske egenskaber, da hanner og hunner er genetisk identiske og deres køn miljømæssigt bestemt. Hanner og hunner er forskellige, hvad angår de første antenners længde og morfologi, idet hannernes antenner er længere end hunnernes (fig. 1). Denne forskel kan observeres umiddelbart efter fødslen, selv om andre sekundære kønskarakteristika udvikler sig i takt med deres vækst (se f.eks. fig. 2 i Olmstead and LeBlanc, 2000).

For at kunne observere det morfologiske køn bør nyfødte af hvert enkelt forsøgsdyr overføres med pipette og anbringes i en petriskål med testmedium. Mediet holdes på et minimum for at begrænse dyrenes bevægelsesfrihed. De første antenner kan observeres under et stereomikroskop (× 10-60).

Fig. 1

24 timer gammel han (til venstre) og hun (til højre) af *D. magna*. Hanner kan skelnes fra hunner ved de første antenners længde og morfologi som vist i cirklerne (Tatarazako *et al.*, 2004).



REFERENCER

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. **JORDMIKROORGANISMER: KVÆLSTOFOMDANNELSESTEST**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 216 (2000).

1.1. INDLEDNING

Den beskrevne metode er en laboratoriemetode til undersøgelse af langtidsvirkningerne på jordmikroorganismers kvælstofomdannende aktivitet af enkeltstående eksponering for kemiske stoffer. Metoden er hovedsagelig baseret på anbefalinger fra Plantebeskyttelsesorganisationen for Europa og Middelhavsområderne (1). Der er endvidere taget hensyn til guidelines fra den tyske Biologische Bundesanstalt (2), den amerikanske miljøstyrelse (3), SETAC (4) og Den Internationale Standardiseringsorganisation (5). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate, Italien, i 1995 (6), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test. Anbefalingerne for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver er baseret på en ISO-vejledning (7) og på anbefalingerne fra workshoppen i Belgirate, Ved vurdering af prøvestoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at bestemme virkningerne på den mikrobielle aktivitet i jord, f.eks. når der kræves oplysninger om plantebeskyttelsesmidlers potentielle bivirkninger på mikrofloraen i jorden, eller når jordmikroorganismer forventes udsat for andre kemiske stoffer end plantebeskyttelsesmidler. Kvælstofomdannelsesprøven udføres for at bestemme virkningerne af sådanne kemiske stoffer på mikrofloraen i jorden. Ved test af landbrugskemikalier (f.eks. plantebeskyttelsesmidler, kunstgødning og skovbrugskemikalier) udføres både kvælstofomdannelses- og kulstofomdannelsestest. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier er kvælstofomdannelsestesten tilstrækkelig. Viser sådanne kemiske stoffer sig imidlertid i kvælstofomdannelsestesten at have en EC_{50}-værdi i samme område som gængse nitrifikationsinhibitorer (f.eks. nitrapyrin), kan en kulstofomdannelsestest udføres for at skaffe yderligere oplysninger.

Jord består af levende og ikke levende komponenter, som er til stede i komplekse og heterogene blandinger. Mikroorganismer spiller en vigtig rolle i nedbrydning og omdannelse af det organiske stof i frugtbar jord, og mange arter bidrager til flere forskellige aspekter af jordens frugtbarhed. Hvis der gennem længere tid gribes ind i disse biokemiske processer, kan det gribe ind i næringsstofcyklussen, således at jordens frugtbarhed ændrer sig. Kulstof- og kvælstofomdannelse finder sted i al frugtbar jord. Skønt det alt efter jordtypen er forskellige mikrobielle samfund, som er ansvarlige for disse processer, følger omdannelsen i det væsentlige altid samme vej.

Den her beskrevne forsøgsmetode anvendes til bestemmelse af stoffers langsigtede skadevirkning på kvælstofomdannelsesprocessen i jordens aerobe dæklag. Metoden giver desuden mulighed for at bedømme stoffernes indvirkning på den mikrobielle kulstofomdannelse i jorden. Efter nedbrydning af bindingerne mellem kulstof og kvælstof dannes nitrat. Finder man lige stor nitratproduktion i den behandlede jord og i kontroljord, er de vigtigste kulstotfnedbrydningsveje derfor højst sandsynligt intakte og funktionsdygtige. Det ved testen anvendte substrat (finmalet lucernemel) har et gunstigt kulstof-/kvælstofforhold (sædvanligvis mellem 12/1 og 16/1). Dette mindsker kulstofmanglen under testen, og hvis de mikrobielle samfund beskadiges af et kemikalie, kan de muligvis komme på fode inden for 100 dage.

▼B

De test, som metoden oprindeligt er baseret på, er hovedsagelig udviklet til stoffer, for hvilke den til jorden tilførte mængde er kendt på forhånd. Det er f.eks. tilfældet for plantebeskyttelsesmidler, hvor spredemængden i marken kendes. For landbrugskemikalier er det tilstrækkeligt at teste to doser, som er relevante for den forventede eller forudsete spredemængde. Landbrugskemikalier kan enten testes som aktivt indholdsstof eller som færdigformuleret produkt. Testen er dog ikke begrænset til landbrugskemikalier. Ved at ændre dels den tilførte mængde teststof til jorden, dels metoden til vurdering af data kan man desuden anvende testen på kemiske stoffer, hvor man ikke kender den mængde, som vil nå jorden. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier bestemmes virkningen af en række koncentrationer på kvælstofomdannelsen. Data fra disse forsøg anvendes til at opstille en dosis-responskurve og beregne værdier af EC_x hvor x er den definerede virkning i %.

1.2. DEFINITIONER

Kvælstofomdannelse: den fuldstændige mikrobielle nedbrydning af kvælstofholdigt organisk stof via ammonifikations- og nitrifikationprocesser til det pågældende uorganiske nitrat som slutprodukt.

EC_x (effektiv koncentration): den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en hæmning på x procent af kvælstofomdannelsen til nitrat.

EC_{50} (effektiv mediankoncentration): den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en 50 % hæmning af kvælstoffets omdannelse til nitrat.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Siet jord forbedres med finmalet plantemel og behandles enten med prøvestoffet eller lades ubehandlet (kontrol). Til test af landbrugskemikalier anbefales mindst to prøvekoncentrationer, som vælges i henhold til den højeste forventede koncentration i marken. Efter 0, 7, 14 og 28 døgns inkubation ekstraheret prøver af behandlet jord og kontroljord med et passende opløsningsmiddel, og nitratmængden i ekstrakterne bestemmes. Nitratomdannelsen i de behandlede prøver sammenholdes med omdannelsen i kontrolprøverne, og den procentuelle afvigelse af de behandlede prøver fra kontrolprøverne beregnes. Alle forsøg løber over mindst 28 døgn. Er forskellen mellem behandlet og ubehandlet jord 25 % eller derover på dag 28, fortsættes målingerne indtil højst 100 dage. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier tilsættes en række koncentrationer af prøvestoffet til jordprøverne, og den dannede mængde kvælstof i behandlede prøver og kontrolprøver måles efter 28 døgns inkubation. Resultaterne af forsøg med flere koncentrationer analyseres efter en regressionsmodel, og EC_x-værdierne beregnes (dvs. EC_{50}, EC_{25} og/eller EC_{10}). Jf. definitionerne.

1.5. FORSØGETS VALIDITET

Vurdering af forsøgsresultater med landbrugskemikalier bygger på nogle forholdsvis små forskelle (gennemsnitligt ± 25 %) mellem nitratkoncentrationen i kontrolprøver og i behandlet jord, hvorfor store variationer i kontrolprøverne kan give forkerte resultater. Afvigelsen mellem gentagne kontrolprøver skal derfor være mindre end ± 15 %.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.6.1 **Apparatur**

Prøvebeholderne skal være udført i kemisk inaktivt materiale. De skal have passende kapacitet svarende til den metode, der anvendes til inkubation af jordprøverne, dvs. inkubation af den samlede mængde eller som en række individuelle jordprøver (jf. 1.7.1.2), Der skal være draget omsorg både for at vandtabet minimeres og at gasser kan udveksles under prøven (f.eks. kan prøvebeholderne tildækkes med perforeret polyethylenfolie). Ved test af flygtige stoffer skal anvendes forseglede og gastætte beholdere. Beholderne skal have en størrelse, så deres rumfang er ca. en fjerdedel udfyldt af jordprøven.

Der anvendes standardlaboratorieudstyr, herunder følgende:

— til omrystning: mekanisk rystebord eller tilsvarende

— centrifuge (3 000 g) eller filtreringsanordning (med nitratfrit filterpapir)

— instrument til nitratanalyse med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed.

1.6.2. **Jordtyper og antal heraf**

Der anvendes én enkelt jordtype. Følgende jordkarakteristika anbefales:

— sandindhold: mindst 50 % og ikke over 75 %

— pH: 5,5-7,5

— organisk kulstofindhold: 0,5-1,5 %

— den mikrobielle biomasse skal måles (8)(9), og dens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold.

I de fleste tilfælde vil en jord med sådanne egenskaber repræsentere den værst tænkelige situation, da prøvestoffets adsorption er minimal og dets tilgængelighed for mikrofloraen maksimal. Sædvanligvis behøver man derfor ikke udføre forsøg med andre jordtyper. Under visse omstændigheder, f.eks. når prøvestoffet hovedsagelig forventes anvendt i bestemte jordtyper som sur skovbundsjord eller når der er tale om elektrostatisk ladede kemiske stoffer, kan det være nødvendigt at anvende en yderligere jordtype.

▼B

1.6.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.6.3.1. *Indsamling*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet. Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, dato for behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder. Til indsamling af jord skal vælges et areal, som kan anvendes gennem længere tid. Egnede er arealer med vedvarende græs, marker med årlig kornhøst (bortset fra majs) eller tæt tilsået grøngødskning. De valgte prøvetagningsarealer må ikke have været behandlet med plantebeskyttelsesmidler i mindst ét år forud for prøvetagningen. Endvidere må der ikke have været anvendt organisk gødning inden for de sidste seks måneder. Anvendelse af mineralsk gødning er kun acceptabel, når det sker i overensstemmelse med afgrødens behov, og når jordprøverne tidligst udtages tre måneder efter udbringning af gødningen. Jord, som har været behandlet med kunstgødning med kendt biocid virkning (f.eks calciumeyanamid) bør ikke anvendes.

Prøvetagning bør undgås under eller umiddelbart efter lange perioder (mere end 30 dage) med tørke eller oversvømmelse. Af pløjet jord tages prøver fra en dybde af 0 ned til 20 cm. For græsningsarealer eller andre jordtyper, hvor der ikke pløjes i længere perioder (mindst én vækstsæson), kan den maksimale prøvetagningsdybde være en smule mere end 20 cm (f.eks. ned til 25 cm).

Jordprøverne skal transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at jordens oprindelige egenskaber med sikkerhed ikke ændrer sig nævneværdigt.

1.6.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Er opbevaring i laboratoriet ikke til at undgå, kan jorden opbevares i mørke ved 4 + 2 °C i indtil tre måneder. Under opbevaringen skal aerobe forhold være sikret. Er jorden indsamlet fra områder, hvor den er frossen mindst tre måneder årligt, kan opbevaring i seks måneder ved minus 18 °C til minus 22 °C overvejes. Den mikrobielle biomasse af de opbevarede jordprøver måles før hvert forsøg, og biomassens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold (se 1.6.2).

1.6.4. **Håndtering og klargøring af jordprøver til forsøget**

1.6.4.1. *Præinkubering*

Har jorden været opbevaret (jf. 1.6.3.2), anbefales præinkubering i et tidsrum på mellem 2 og 28 døgn. Under præinkuberingen skal jordens temperatur- og fugtindhold svare til forsøgsbetingelserne (se 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fysisk-kemiske egenskaber*

Jorden befries manuelt for store genstande (f.eks. sten, plantedele osv.) og sies derefter våd uden for megen udtørring til en partikelstørrelse på højst 2 mm. Jordprøvens fugtindhold justeres ved hjælp af destilleret eller demineraliseret vand til en værdi mellem 40 % og 60 % af den maksimale vandholdende evne.

1.6.4.3. *Forbedring med organisk substrat*

Jorden skal forbedres med et passende organisk substrat, f.eks. finmalet lucernegræs-grønmel (hovedkomponent: Medicago saliva) med etC/N-forhold mellem 12/1 og 16/1. Det anbefalede lucerne-jord-forhold er 5 g lucerne pr. kilogram jord (tør vægt).

1.6.5. **Klargøring af prøvestoffet til tilføring til jorden**

Prøvestoffet tilføres normalt ved hjælp af et bærestof. Bærestoffet kan være vand (til vandopløselige stoffer) eller et inaktivt fast stof som finkornet kvartssand (partikelstørrelse: 0,1 - 0,5 mm). Man bør undgå andre flydende bærestoffer end vand (f.eks. organiske opløsningsmidler som acetone eller chloroform), da de kan skade mikrofloraen. Anvendes sand som bærestof, kan det coates med prøvestof, som er opløst eller opslæmmet i et passende opløsningsmiddel. I så fald skal opløsningsmidlet fjernes ved fordampning før opblanding med jorden. For at få den bedst mulige fordeling af prøvestoffet i jorden anbefales et forhold på 10 g sand pr. kilogram jord (tør vægt). Kontrolprøver behandles kun med den tilsvarende mængde vand og/eller kvartssand.

Ved test af flygtige kemiske stoffer må tab under behandlingen så vidt muligt undgås, og det må tilstræbes at sikre ensartet fordeling i jorden (f.eks. bør prøvestoffet sprøjtes i jorden i flere punkter).

1.6.6. **Prøvekoncentrationer**

Af landbrugskemikalier skal anvendes mindst to koncentrationer. Den lave koncentration skal afspejle mindst den maksimale mængde, som under praktiske forhold forventes at nå jorden, og den høje koncentration skal være et multiplum af den lave koncentration. Ved beregning af den tilsatte prøvestofkoncentration til jorden forudsættes homogen tilsætning til en dybde af 5 cm og en bulkdensitet af jorden på 1,5. For landbrugskemikalier, som tilføres jorden direkte, og for kemiske stoffer, for hvilke det kan forudsiges, i hvilken mængde de når jorden, anbefales som prøvekoncentrationer den maksimale forventede eksponeringskoncentration (Predicted Environmental Concentration, PEC) samt fem gange denne koncentration. Stoffer, som forventes tilført jorden flere gange i løbet af én sæson, skal testes ved koncentrationer, som fås ved at gange eksponeringskoncentrationen med det maksimale forventede antal tilførsler. Den højeste testede koncentration må dog ikke svare til mere end ti gange den maksimale mængde ved én tilførsel. Afprøves andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, som danner en kvotientrække. De afprøvede koncentrationer skal dække det område, der er nødvendigt tor at fastlægge EC_x-værdierne.

▼B

1.7. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.7.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.7.1.1. *Behandlingsprøver og kontrolprøver*

Ved test af landbrugskemikalier deles jorden i tre portioner med samme vægt. To portioner blandes med bærestof indeholdende produktet, den tredje med bærestof uden produkt (kontrol). Det anbefales at benytte mindst tre gentagelser for både behandlet og ubehandlet jord. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier deles jorden i seks portioner med samme vægt. Fem af prøverne blandes med bærestof indeholdende prøvestof, og den sjette blandes med bærestof uden prøvestof. Der anbefales tre gentagelser for både behandlings- og kontrolgruppe. Der drages omsorg for at sikre ensartet fordeling af prøvestoffet i de behandlede jordprøver. Under blandingen bør komprimering og kugledannelse af jorden undgås.

1.7.1.2 *Inkubering af jordprøver*

Inkubering af jordprøver kan ske på to måder: som bulkprøve af behandlet og ubehandlet jord eller som en række lige store delprøver af hver behandlet og ubehandlet jord. Ved test af flygtige prøvestoffer må forsøget dog kun udføres med en række særskilte delprøver. Når jorden inkuberes som bulkprøve, tilberedes store mængder af hver behandlet og ubehandlet jord, og under forsøget udtages efter behov delprøver til analyse. Hvor stor en mængde, som fra begyndelsen skal klargøres til hver behandlings-og kontrolprøve, afhænger af antal delprøver, antal gentagelser af analyserne og det forventede maksimale antal prøvetagningstidspunkter. Når jorden inkuberes som bulkprøve, skal den blandes grundigt før udtagning af delprøver. Når jorden inkuberes som en række særskilte jordprøver, skal hver behandlet og ubehandlet bulkjord deles i det nødvendige antal delprøver, og disse anvendes efter behov, Forventes flere end to prøvetagningstidspunkter i forsøget, tilberedes så mange delprøver, at de rækker til alle gentagelser og alle prøvetagningstidspunkter. Der inkuberes mindst tredobbelte prøver af prøvejorden under aerobe betingelser (se 1.7.1,1). Til alle forsøg skal anvendes passende beholdere med tilstrækkeligt headspace til at undgå opståen af anaerobe betingelser. Ved test af flygtige prøvestoffer udføres forsøget kun med en række særskilte delprøver.

1.7.1.3. *Prøvningsbetingelser og forsøgsvarighed*

Forsøget udføres i mørke ved en rumtemperatur på 20 ± 2 °C, Under forsøget holdes prøvens fugtindhold på en værdi svarende til mellem 40 % og 60 % af jordens maksimale vandholdende evne (se 1.6.4.2) med en variation på = 5 %. Efter behov kan tilsættes destilleret, demineraliseret vand.

Forsøgenes mindste varighed er 28 døgn. Ved test af landbrugskemikalier sammenholdes nitratdannelsen i behandlede prøver og kontrolprøver. Hvis forskellen mellem dem på dag 28 er over 25 %, fortsættes forsøget, indtil forskellen mellem dem er 25 % eller derunder, dog højst i 100 dage. For andre stoffer end landbrugskemikalier ophører forsøget efter 28 dage. På dag 28 bestemmes nitratmængden i behandlede prøver og kontrolprøver, og EC_x-værdierne beregnes.

▼B

1.7.2. **Prøvetagningsplan for analyse af jord**

1.7.2.1. *Prøvetagningsplan for jordprøver*

Ved test af landbrugskemikalier analyseres jordprøverne for nitrat på dag 0, 7, 14 og 28. Er det nødvendigt at forlænge forsøget, fortsættes målingerne efter dag 28 med 14 dages mellemrum.

Testes andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, og jordprøverne analyseres for nitrat ved eksponeringsperiodens start (dag 0) og slutning (dag 28). En mellemliggende måling, f.eks. dag 7, kan foretages hvis det anses for nødvendigt. Data registreret på dag 28 anvendes til bestemmelse af stoffets EC_x-værdi. Om ønsket kan værdierne for kontrolprøverne på dag 0 anvendes som jordens startindhold af nitrat.

1.7.2.2. *Analyse af jordprøver*

Nitratmængden i hver gentagelse for behandlede prøver og kontrolprøver bestemmes ved hvert prøvetagningstidspunkt, Nitratindholdet i jorden ekstraheres ved udrystning med en passende ekstraktionsvæske, f.eks. en 0,1 M kaliumchloridopløsning. Det tilrådes at anvende en mængde KCl-opløsning på 5 ml pr. gram tør jord. For at optimere ekstraktionen bør beholderne med jord og ekstraktionsvæske ikke være mere end halvt fyldte. Blandingerne omrystes ved 150 o./min, i 60 minutter. Blandingerne centrifugeres eller filtreres, og væskefaserne analyseres for nitrat. Partikelfri væskeformige ekstrakter kan opbevares ved 20 ± 5 °C i indtil seks måneder.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Ved test af landbrugskemikalier skal den dannede nitratmængde i hver gentagelse af jordprøven registreres, og gennemsnitsværdien for alle gentagelser angives i tabelform. Kvælstofomdannelsen bedømmes ved egnede og almindeligt anerkendte statistiske metoder (f.eks F-test, 5 % signifikansniveau). Den dannede mængde nitrat angives som mg nitrat/kg tør jord/døgn. Nitratdannelsen ved hver behandling sammenholdes med kontrolprøvens, og den procentuelle afvigelse fra kontrolprøven beregnes.

Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier bestemmes den dannede mængde nitrat for hver gentagelse, og der opstilles en dosis-responskurve til bestemmelse af EC_x-værdierne. Den nitratmængde (dvs. mg nitrat/kg tør jord), som er fundet i de behandlede prøver efter 28 døgn, sammenholdes med den, der er bestemt i kontrolprøverne. Af disse data beregnes for hver prøvestofkoncentration hæmningen i procent. Disse procentværdier afsættes mod koncentrationen, og EC_x-værdierne beregnes. Desuden bestemmes konfidensgrænser ($p = 0,95$) for de beregnede EC_x-værdier ved hjælp af standardmetoder (10)(l 1)(12).

Prøvestoffer med højt kvælstofindhold kan bidrage til den mængde nitrat, som dannes under forsøget. Hvis disse stoffer testes i høj koncentration (f.eks. stoffer som forventes anvendt til gentagen påførsel), skal passende kontrolprøver indgå i forsøget (dvs. jord med prøvestof, men uden plantemel). Data fra disse kontrolprøver skal indgå i beregningerne af EC_x.

▼B

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Når man ved test af landbrugskemikalier finder, at forskellen mellem kvælstofdannelsen i prøver, som er behandlet med den laveste mængde (dvs. den forventede maksimale koncentration), og i kontrolprøven ikke er over 25 % på noget prøvetagningstidspunkt efter dag 28. kan produktet anses for at være uden langtidsvirkning på kvælstofomdannelsen i jord. Ved vurdering af forsøg med andre stoffer end landbrugskemikalier anvendes EC_{50}, EC_{25} og/eller EC_{10}-værdier.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Fuldstændig identifikation af den anvendte jord, med angivelse af:

— stedsbestemmelse for lokaliteten (geografisk bredde og længde)

— historiske oplysninger om arealet (dvs. plantedække, behandling med plantebeskyttelsesmidler, behandling med kunstgødning, uheldsbetinget forurening osv.)

— anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

— prøvetagningsdybde (cm)

— indhold af sand/silt/ler (tør vægt %)

— pH (i vand)

— organisk kulstofindhold (tør vægt %)

— kvælstofindhold (tør vægt %)

— startkoncentration af nitrat (mg nitrat/kg tør vægt)

— kationbytningskapacitet (mmol/kg)

— mikrobiel biomasse, angivet som procent af samlet mængde organisk kulstof

— henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

— udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

— nærmere oplysning om eventuel præinkubering af jorden.

Prøvestof:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— når det er relevant, data til kemisk identifikation, herunder strukturformel, renhed (dvs., for plantebeskyttelsesprodukter, procentdel aktivt indholdsstof), kvælstofindhold.

Substrat:

— substratets oprindelse

— sammensætning (dvs. lucernemel, lucernegræs-grønmel)

— kulstofindhold, kvælstofindhold (tør vægt %)

— kornstørrelse (mm).

▼B

Forsøgsbetingelser:

— Enkeltheder vedrørende forbedring af jorden med organisk substrat

— det anvendte antal koncentrationer af prøvestoffet og, når det er hensigtsmæssigt, begrundelse for de valgte koncentrationer

— enkeltheder vedrørende tilsætning af prøvestoffet til jorden

— inkubationstemperatur

— jordens vandindhold ved forsøgets start og under forsøget

— metode anvendt ved inkubation af jorden (dvs. som bulk eller som en række særskilte delprøver)

— antal gentagelser

— prøvetagningstidspunkter

— metode anvendt til ekstraktion af nitrat af jorden.

Resultater:

— anvendt analysemetode og udstyr til nitratanalyse

— data i tabelform, bestående af enkeltværdier og gennemsnit for nitratmålingerne

— variation mellem gentagelserne for behandlede prøver og kontrolprøver

— forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

— den procentuelle variation i kvælstofdannelsen ved hvert prøvetagningstidspunkt eller, hvis det er hensigtsmæssigt, EC_{50}-værdi med 95 % konfidensgrænse, anden EC-værdi (dvs. EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervaller, og grafisk fremstilling af dosis-responskurve

— statistisk behandling af resultaterne

— alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990), Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. udg., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test, EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. september 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality — Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, 18.-20. januar 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997), Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997), Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour, Pharmacol, and Exper. Then, 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis. 3. udg., Cambridge, London og New York.

(12) Finney, D.J. (1978), Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. **JORDMIKROORGANISMER: KULSTOFOMDANNELSESTEST**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 217 (2000).

1.1. INDLEDNING

Den beskrevne metode er en laboratoriemetode til undersøgelse af langtidsvirkningerne på jordmikroorganismers kulstofomdannende aktivitet af enkeltstående eksponering for plantebeskyttelsesmidler og eventuelt også andre kemiske stoffer. Metoden er hovedsagelig baseret på anbefalinger fra Plantebeskyttelsesorganisationen for Europa og Middelhavsområderne (1). Der er endvidere taget hensyn til guidelines fra den tyske Biologische Bundesanstalt (2), den amerikanske miljøstyrelse (3), og SETAC (4). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate. Italien, i 1995 (5), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test, Anbefalingerne for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver er baseret på en ISO-vejledning (6) og på anbefalingerne fra workshoppen i Belgirate.

Ved vurdering af prøvestoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at bestemme virkningerne på den mikrobielle aktivitet i jord, f.eks. når der kræves oplysninger om plantebeskyttelsesmidlers potentielle bivirkninger på mikrofloraen i jorden, eller når jordmikroorganismer forventes udsat for andre kemiske stoffer end plantebeskyttelsesmidler. Kulstofomdannelsestesten udføres for at bestemme virkningerne af sådanne kemiske stoffer på mikrofloraen i jorden. Ved test af landbrugskemikalier (f.eks. plantebeskyttelsesmidler, kunstgødning og skovbrugskemikalier) udføres både kulstofomdannelses- og kvælstofomdannelsestest. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier er kvælstofomdannelsestesten tilstrækkelig. Viser sådanne kemiske stoffer sig imidlertid i kvælstofomdannelsestesten at have en EC_{50}-værdi i samme område som gængse nitrifikationsinhibitorer (f.eks. nitrapyrin), kan en kulstofomdannelsestest udføres for at skaffe yderligere oplysninger.

Jord består af levende og ikke levende komponenter, som er til stede i komplekse og heterogene blandinger. Mikroorganismer spiller en vigtig rolle i nedbrydning og omdannelse af det organiske stof i frugtbar jord, og mange arter bidrager til flere forskellige aspekter af jordens frugtbarhed. Hvis der gennem længere tid gribes ind i disse biokemiske processer, kan det gribe ind i næringsstofcyklussen, således at jordens frugtbarhed ændrer sig. Kulstof- og kvælstofomdannelse finder sted i al frugtbar jord. Skønt det alt efter jordtypen er forskellige mikrobielle samfund, som er ansvarlige for disse processer, følger omdannelsen i det væsentlige altid samme vej.

▼B

Den her beskrevne forsøgsmetode anvendes til bestemmelse af stoffers langsigtede skadevirkning på kulstofomdannelsesprocessen i jordens aerobe dæklag. Metoden er følsom for ændringer i størrelse og aktivitet af de mikrobielle samfund, som er ansvarlige for kulstofomdannelsen, da den udsætter disse samfund for både kemisk stress og kulstofmangel. Der anvendes en sandet jord med lavt indhold af organisk stof. Jorden behandles med prøvestoffet og inkuberes under betingelser, som giver mulighed for et hurtigt mikrobielt stofskifte. Under disse betingelser udtømmes kilderne til umiddelbart tilgængeligt kulstof i jorden hurtigt. Derved opstår der kulstofmangel, som både forårsager celledød og inducerer dvaletilstand og/eller sporedannelse, Hvis forsøget løber over mere end 28 dage, kan man i kontrolprøver (med ubehandlet jord) følge disse reaktioner som et gradvist tab i metabolisk aktiv mikrobiel biomasse (7). Hvis biomassen i jord, som er udsat for kulstofmangel, under prøvebetingelserne påvirkes af tilstedeværelse af et kemisk stof, vil den ikke nødvendigvis vende tilbage til samme niveau som kontrolprøvens. Forstyrrelser, som på et vilkårligt tidspunkt under prøven er fremkaldt af prøvestoffet, vil således ofte vare ved indtil forsøgets slutning.

De test, som metoden oprindeligt er baseret på, er hovedsagelig udviklet til stoffer, for hvilke den til jorden tilførte mængde er kendt på forhånd. Det er f.eks. tilfældet for plantebeskyttelsesmidler, hvor spredemængden i marken kendes. For landbrugskemikalier er det tilstrækkeligt at teste to doser, som er relevante for den forventede eller forudsete spredemængde. Landbrugskemikalier kan enten testes som aktivt indholdsstof eller som færdigformuleret produkt. Testen er dog ikke begrænset til kemiske stoffer med forudsigelig miljøkoncentration. Ved at fendre dels den tilførte mængde prøvestof til jorden, dels metoden til vurdering af data kan man desuden anvende testen på kemiske stoffer, hvor man ikke kender den mængde, som vil nå jorden. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier bestemmes virkningen af en række koncentrationer på kulstofomdannelsen. Data fra disse forsøg anvendes til at opstille en dosis-responskurve og beregne værdier af $EC_{x,}$ hvor x er den definerede virkning i %.

1.2. DEFINITIONER

Kulstofomdannelse, mikrobiel nedbrydning af organisk stof til kuldioxid som uorganisk slutprodukt.

EC_x (effektiv koncentration), den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en x % hæmning af kulstoffets omdannelse til kuldioxid.

EC_{50} (effektiv mediankoncentration), den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en 50 % hæmning af kulstoffets omdannelse til kuldioxid.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

▼B

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Siet jord behandles enten med prøvestoffet eller lades ubehandlet (kontrol). Til test af landbrugskemikalier anbefales mindst to prøvekoncentrationer, som vælges i henhold til den højeste forventede koncentration i marken. Efter inkubation i 0, 7, 14 og 28 døgn blandes prøver af behandlet jord og kontroljord med glucose, og den glucoseinducerede respiration måles gennem 12 timer uden afbrydelse, Respirationshastigheden angives enten som kuldioxidproduktionshastighed (mg kuldioxid/kg tør jord/h) eller som iltforbrugshastighed (mg ilt/kg jord/h). Den gennemsnitlige respirationshastighed i de behandlede jordprøver sammenholdes med kontrolprøvernes, og den procentuelle afvigelse af de behandlede prøver fra kontrolprøverne beregnes. Alle forsøg løber over mindst 28 døgn. Hvis der på dag 28 er mere end 25 % forskel mellem behandlet og ubehandlet jord, fortsættes målingerne med 14 dages intervaller indtil højst 100 dage. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier tilsættes prøvestoffet i en række koncentrationer til jordprøverne, og den glucoseinducerede respirationshastighed (dvs. den gennemsnitlig kuldioxiddannelse eller det gennemsnitlige iltforbrug) måles efter 28 døgn. Resultaterne af forsøg med flere koncentrationer analyseres efter en regressionsmodel, og EC_x-værdierne beregnes (dvs. $EC_{.50}$, EC_{25} og/eller EC_{10}). Jf. definitionerne.

1.5. FORSØGETS VALIDITET

Vurdering af forsøgsresultater med landbrugskemikalier bygger på nogle forholdsvis små forskelle (gennemsnitligt ± 25 %) mellem kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i kontrolprøver og i behandlede jordprøver, hvorfor store variationer i kontrolprøverne kan give forkerte resultater. Afvigelsen mellem gentagne kontrolprøver skal derfor være mindre end ± 15 %.

1.6. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Prøvebeholderne skal være udført i kemisk inaktivt materiale. De skal have passende kapacitet svarende til den metode, der anvendes til inkubation af jordprøverne, dvs. inkubation af den samlede mængde eller som en række særskilte jordprøver (jf. 1.7.1.2). Der skal være draget omsorg både for minimering af vandtabet og udveksling af gasser under forsøget (f.eks. kan prøvebeholderne tildækkes med perforeret polyethylenfolie). Ved test af flygtige stoffer skal anvendes forseglede og gastætte beholdere. Beholderne skal have en størrelse, så jordprøven udfylder ca. en fjerdedel af deres rumfang.

Til bestemmelse af glucoseinduceret respiration skal anvendes inkubationssystemer og apparatur til måling af kuldioxidproduktion eller iltforbrug. Eksempler på sådanne systemer og apparatur findes i litteraturen (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Jordtyper og antal heraf**

Der anvendes én enkelt jordtype. Følgende jordkarakteristika anbefales:

— sandindhold: mindst 50 % og ikke over 75 %

▼B

— pH: 5,5-7,5

— organisk kulstofindhold: 0,5-1,5 %

— den mikrobielle biomasse skal måles (12)(13), og dens kulstof indhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold,

I de fleste tilfælde vil en jord med sådanne egenskaber repræsentere den værst tænkelige situation, da prøvestoffets adsorption er minimeret og dets tilgængelighed for mikrofloraen maksimal. Sædvanligvis behøver man derfor ikke udføre forsøg med andre jordtyper. Under visse omstændigheder, f.eks, når prøvestoffet hovedsagelig forventes anvendt i bestemte jordtyper som sur skovbundsjord eller når der er tale om elektrostatisk ladede kemiske stoffer, kan det være nødvendigt at anvende en yderligere jordtype.

1.6.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.6.3.1. *Indsamling*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet, Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, dato for behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder. Til indsamling af jord skal vælges et areal, som kan anvendes gennem længere tid. Egnede er arealer med vedvarende græs, marker med årlig kornhøst (bortset fra majs) eller tæt tilsået grøngødskning, De valgte prøvetagningsarealer må ikke have været behandlet med plantebeskyttelsesmidler i mindst ét år forud for prøvetagningen. Endvidere må der ikke have været anvendt organisk gødning inden for de sidste seks måneder. Anvendelse af mineralsk gødning er kun acceptabel, når det sker i overensstemmelse med afgrødens behov, og når jordprøverne tidligst udtages tre måneder efter udbringning af gødningen. Jord, som har været behandlet med kunstgødning med kendt biocid virkning (f.eks calciumcyanamid) bør ikke anvendes.

Prøvetagning bør undgås under eller umiddelbart efter lange perioder (mere end 30 dage) med tørke eller oversvømmelse. Af pløjet jord tages prøver fra en dybde af 0 ned til 20 cm. For græsningsarealer eller andre jordtyper, hvor der ikke pløjes i længere perioder (mindst én vækstsæson), kan den maksimale prøvetagningsdybde være en smule mere end 20 cm (f.eks. ned til 25 cm). Jordprøverne skal transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at jordens oprindelige egenskaber med sikkerhed ikke ændrer sig nævneværdigt,

1.6.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Er opbevaring i laboratoriet ikke til at undgå, kan jorden opbevares i mørke ved 4 ± 2 °C i indtil tre måneder. Under opbevaringen skal aerobe forhold være sikret. Er jorden indsamlet fra områder, hvor den er frossen mindst tre måneder årligt, kan opbevaring i seks måneder ved minus 18 °C overvejes. Den mikrobielle biomasse af de opbevarede jordprøver måles før hvert forsøg, og biomassens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold (se 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Håndtering og klargøring af jordprøver til forsøget**

1.6.4.1. *Præinkubering*

Har jorden været opbevaret (jf. 1.6.4.2 og 1.7.1.3), anbefales præinkubering i et tidsrum på mellem 2 og 28 døgn. Under præinkuberingen skal jordens temperatur- og fugtindhold svare til forsøgsbetingelserne (se 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysisk-kemiske egenskaber*

Jorden befries manuelt for store genstande (f.eks. sten, plantedele osv.) og sies derefter våd uden for megen udtørring til en partikelstørrelse på højst 2 mm. Jordprøvens fugtindhold justeres ved hjælp af destilleret eller demineraliseret vand til en værdi mellem 40 % og 60 % af den maksimale vandholdende evne.

1.6.5. **Klargøring af prøvestoffet til tilføring til jorden**

Prøvestoffet tilføres normalt ved hjælp af et bærestof. Bærestoffet kan være vand (til vandopløselige stoffer) eller et inaktivt fast stof som finkornet kvartssand (partikelstørrelse: 0,1-0,5 mm), Man bør undgå andre flydende bærestoffer end vand (f.eks. organiske opløsningsmidler som acetone eller chloroform), da de kan skade mikrofloraen. Anvendes sand som bærestof, kan det coates med prøvestof, som er opløst eller opslæmmet i et passende opløsningsmiddel. I så fald skal opløsningsmidlet fjernes ved fordampning før opblanding med jorden. For at få den bedst mulige fordeling af prøvestoffet i jorden anbefales et forhold på 10 g sand pr. kilogram jord (tør vægt). Kontrolprøver behandles kun med den tilsvarende mængde vand og/eller kvartssand.

Ved test af flygtige kemiske stoffer må tab under behandlingen undgås, og det må tilstræbes at sikre ensartet fordeling i jorden (f.eks. bør prøvestoffet sprøjtes i jorden i flere punkter).

1.6.6. **Prøvekoncentrationer**

Af landbrugskemikalier og andre kemiske stoffer med forudsigelig eksponeringskoncentration testes mindst to koncentrationer. Den lave koncentration skal afspejle mindst den maksimale mængde, som under praktiske forhold forventes at nå jorden, og den høje koncentration skal være et multiplum af den lave koncentration, Ved beregning af den tilsatte prøvestofkoncentration til jorden forudsættes homogen tilsætning til en dybde af 5 cm og en bulkdensitet af jorden på 1,5. For landbrugskemikalier, som tilføres jorden direkte, og for kemiske stoffer, for hvilke det kan forudsiges, i hvilken mængde de vil nå jorden, anbefales som prøvekoncentrationer den forventede eksponeringskoncentration (Predicted Environmental Concentration, PEC) samt fem gange denne koncentration. Stoffer, som forventes tilført jorden flere gange i løbet af én sæson, skal testes ved koncentrationer, som fås ved at gange eksponeringskoncentrationen med det maksimale forventede antal tilførsler, De højeste testede koncentration må dog ikke svare til mere end ti gange den maksimale mængde ved én tilførsel.

Afprøves andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, som danner en kvotientrække, De afprøvede koncentrationer skal dække det område, der er nødvendigt for at fastlægge EC_x-værdierne.

▼B

1.7. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.7.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.7.1.1. *Behandlingsprøver og kontrolprøver*

Ved test af landbrugskemikalier deles jorden i tre portioner med samme vægt, To portioner blandes med bærestof indeholdende produktet, den tredje med bærestof uden produkt (kontrol), Det anbefales at benytte mindst tre gentagelser for både behandlet og ubehandlet jord. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier deles jorden i seks portioner med samme vægt. Fem af prøverne blandes med bærestof indeholdende prøvestof, den sjette med bærestof uden prøvestof. Der anbefales tre gentagelser for både behandlings- og kontrolgruppe. Der drages omsorg for at sikre ensartet fordeling af prøvestoffet i de behandlede jordprøver. Under blandingen bør komprimering og kugledannelse af jorden undgås.

1.7.1.2. *Inkubering af jordprøver*

Inkubering af jordprøver kan ske på to måder: som bulkprøve af behandlet og ubehandlet jord eller som en række lige store delprøver af hver behandlet og ubehandlet jord. Ved test af flygtige prøvestoffer må forsøget dog kun udføres med en række særskilte delprøver. Når jorden inkuberes som bulkprøve, tilberedes store mængder af hver behandlet og ubehandlet jord, og under forsøget udtages efter behov delprøver til analyse, Hvor stor en mængde, som fra begyndelsen skal klargøres til hver behandlings-og kontrolprøve, afhænger af antal delprøver, antal gentagelser af analyserne og det forventede maksimale antal prøvetagningstidspunkter. Når jorden inkuberes som bulkprøve, skal den blandes grundigt før udtagning af delprøver. Når jorden inkuberes som en række særskilte jordprøver, skal hver behandlet og ubehandlet bulkjord deles i det nødvendige antal delprøver, og disse anvendes efter behov. Forventes flere end to prøvetagningstidspunkter i forsøget, tilberedes så mange delprøver, at de rækker til alle gentagelser og alle prøvetagningstidspunkter. Der inkuberes mindst tredobbelte prøver af prøvejorden under aerobe betingelser (se 1.7.1.1). Til alle forsøg skal anvendes passende beholdere med tilstrækkeligt headspace til at undgå opståen af anaerobe betingelser, Ved test af flygtige prøvestoffer udføres forsøget kun med en række særskilte delprøver.

1.7.1.3. *Prøvningsbetingelser og forsøgsvarighed*

Forsøget udføres i mørke ved en rumtemperatur på 20 ± 2 °C. Under forsøget holdes prøvens fugtindhold på en værdi svarende til mellem 40 % og 60 % af jordens maksimale vandholdende evne (se 1.6.4.2) med en variation på ± 5 %. Efter behov kan tilsættes destilleret, demineraliseret vand.

Forsøgenes mindste varighed er 28 døgn, Ved test af landbrugskemikalier sammenholdes kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i behandlede prøver og kontrolprøver. Hvis forskellen mellem dem på dag 28 er over 25 %, fortsættes forsøget, indtil forskellen mellem dem er 25 % eller derunder, dog højst i i 100 dage. For andre stoffer end landbrugskemikalier ophører forsøget efter 28 dage. På dag 28 bestemmes kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i behandlede prøver og kontrolprøver, og EC_x-værdierne beregnes.

▼B

1.7.2. **Prøvetagning og analyse af jord**

1.7.2.1. *Prøvetagningsplan for jordprøver*

Ved test af landbrugskemikalier analyseres jordprøverne for glucoseinduceret respirationshastighed på dag 0, 7, 14 og 28. Er det nødvendigt at forlænge forsøget, fortsættes målingerne efter dag 28 med 14 dages mellemrum.

Testes andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, og jordprøverne analyseres for glucoseinduceret respirationshastighed ved eksponeringsperiodens start (dag 0) og slutning (dag 28). En mellemliggende måling, f.eks. på dag 7, kan foretages, hvis det anses for nødvendigt. Data registreret på dag 28 anvendes til bestemmelse af stoffets EC_x-værdi. Om ønsket kan dag 0-værdierne for kontrolprøveme anvendes som startværdier for mængden af metabolisk aktiv biomasse i jorden (12).

1.7.2.2. *Måling af glucoseinduceret respirationshastighed*

Den glucoseinducerede respirationshastighed i hver gentagelse for behandlede prøver og kontrolprøver bestemmes ved hvert prøvetagningstidspunkt. Jordprøverne blandes med en tilstrækkelig mængde glucose til at udløse øjeblikkelig maksimal respiratorisk respons. De nødvendige mængde glucose til fremkaldelse af maksimal respiratorisk respons fra en given jord kan bestemmes i en indledende test, hvor der bruges en række glucosekoncentrationer (14). For sandjord med 0,5-1,5 % organisk kulstof er 2 000 mg til 4 000 mg glucose pr, kg tør jord dog sædvanligvis tilstrækkeligt. Glucosen kan finmales med rent kvartssand (10 g sand/kg tør jord) og iblandes homogent i jorden.

De glucoseforbedrede jordprøver inkuberes i et passende apparat med henblik på måling af respirationshastighed enten kontinuerligt, hver time eller hver anden time (se 1.6.1) ved 20 ± 2 °C. Den afgivne kuldioxid eller den forbrugte ilt måles i 12 timer uden afbrydelse, og målingen begynder snarest muligt, dvs. inden for en til to timer efter glucosetilsætningen. Den samlede kuldioxidproduktion eller det samlede iltforbrug i løbet af de 12 timer måles, og den gennemsnitlige respirationshastighed bestemmes.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Ved test af landbrugskemikalier registreres kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i hver gentagelse af jordprøven, og gennemsnitsværdien for alle gentagelser angives i tabelform. Resultaterne bedømmes ved egnede og almindeligt anerkendte statistiske metoder (f.eks F-test, 5 % signifikansniveau). Den glucoseinducerede respirationshastighed angives i mg kuldioxid/kg tør jord/h eller mg ilt/kg tør jord/h. Den gennemsnitlige kuldioxidproduktionshastighed eller iltforbrugshastighed for hver behandling sammenholdes med kontrolprøvens, og den procentuelle afvigelse fra kontrolprøven beregnes.

▼B

Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier bestemmes kuldioxidproduktion eller iltforbrug for hver gentagelse, og der opstilles en dosis-responskurve til bestemmelse af EC_x-værdierne. Den glucoseinducerede respirationshastighed (dvs. mg kuldioxid/kg tør jord/h eller mg ilt/kg tør jord/h), som findes i de behandlede prøver efter 28 dage, sammenholdes med kontrolprøvernes. Af disse data beregnes hæmningen i procent for hver prøvestofkoncentration. Disse procentværdier afsættes mod koncentrationen, og EC_x-værdierne beregnes ved hjælp af statistiske metoder. Desuden bestemmes konfidensgrænser ($p = 0,95$) for de beregnede EC_xværdier ved hjælp af standardmetoder (15)(16)(17).

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Når man ved test af landbrugskemikalier finder, at forskellen mellem respirationshastigheden i prøver behandlet med den laveste mængde (dvs. den forventede maksimale koncentration) og i kontrolprøve ikke er over 25 % på noget prøvetagningstidspunkt efter dag 28, kan produktet anses for at være uden langtidsvirkning på kulstofomdannelsen i jord. Ved vurdering af forsøg med andre stoffer end landbrugskemikalier anvendes EC_{50}, EC_{25} og/eller EC_{10}-værdier.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Fuldstændig identifikation af den anvendte jord, med angivelse af:

— stedsbestemmelse for lokaliteten (geografisk bredde og længde)

— historiske oplysninger om arealet (dvs. plantedække, behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med kunstgødning, uheldsbetinget forurening osv.)

— anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

— prøvetagningsdybde (cm)

— indhold af sand/silt/ler (tør vægt %)

— pH (i vand)

— organisk kulstofindhold (tør vægt %)

— kvælstofindhold (tør vægt %)

— kationbytningskapacitet (mmol/kg)

— mikrobiel biomasse, angivet som procent af samlet mængde organisk kulstof

— henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

— udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

— nærmere oplysning om eventuel præinkubering af jorden.

▼B

Prøvestof:

— fysisk form og. når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— når det er relevant, data til kemisk identifikation, herunder strukturformel, renhed (dvs, for plantebeskyttelsesprodukter procentdel aktivt indholdsstof), kvælstofindhold.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende forbedring af jorden med organisk substrat

— det anvendte antal koncentrationer af prøvestoffet og, når, det er hensigtsmæssigt, begrundelse for de valgte koncentrationer

— enkeltheder vedrørende tilsætning af prøvestoffet til jorden

— inkubationstemperatur

— jordens vandindhold ved forsøgets start og under forsøget

— metode anvendt ved inkubation af jorden (dvs. som bulk eller som en række særskilte delprøver)

— antal gentagelser

— prøvetagningstidspunkter.

Resultater:

— metode og udstyr anvendt til måling af respiratiunshastighed

— data opstillet som tabeller over enkeltværdier og gennemsnit af kuldioxid- eller oxygenmængden

— variation mellem gentagelserne for behandlede prøver og kontrolprøver

— forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

— den procentuelle variation i den glucoseinducerede respirationshastighed ved hvert prøvetagningstidspunkt eller, i givet fald, EC_{50}-værdi med 95 % konfidensgrænse, anden EC_x-værdi (dvs. EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervaller, og grafisk fremstilling af dosis-responskurve

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne

— alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. udg., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule, 28. september 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, 18-20. januar 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson. J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in »Pesticide Effects on Soil Microflora«. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Kap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in »Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties«. Agronomy Monograph N^{o} 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G, (1989), Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass —Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P, (1986), Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide, (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour, Pharmacol, and Exper.Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3. udg., Cambridge, London og New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I JORD**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 307 (2002)

1.1. INDLEDNING

Denne forsøgsmetode er baseret på eksisterende guidelines (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Den her beskrevne metode er til brug ved undersøgelse af kemiske stoffers aerobe og anaerobe omdannelse i jord. Ved forsøgene bestemmes i) prøvestoffets omdannelseshastighed og ii) art, dannelseshastighed og nedbrydningshastighed af de omdannelsesprodukter, som planter og jordorganismer kan blive udsat for. Sådanne undersøgelser er nødvendige for kemiske stoffer, som tilføres jorden direkte eller må forventes at nå frem til jordmiljøet. Resultaterne af sådanne laboratorieforsøg kan desuden anvendes til at opstille protokoller for prøvetagning og analyse i tilknyttede markundersøgelser.

Til vurdering af omdannelsesveje er aerobe og anaerobe forsøg med én jordtype sædvanligvis tilstrækkelige (8)(10)(11). Omdannelseshastigheden skal bestemmes i mindst tre yderligere jordtyper (8)(10).

På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype i Belgirate, Italien, i 1995 (10) enedes man specielt om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i dette forsøg. De testede jordtyper skal være repræsentative for de miljøforhold, hvor stoffet skal anvendes eller vil blive udledt. For eksempel skal kemiske stoffer, som kan blive udledt i subtropisk til tropisk klima, testes med Ferrasoler eller Nitosoler (FAO-systemet). Workshoppen resulterede desuden i anbefalinger for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver, baseret på ISO-vejledningen (15). Anvendelse af overrislet jord (til risdyrkning) er ligeledes tilgodeset i metoden.

1.2. DEFINITIONER

Prøvestof: et vilkårligt stof, som enten er moderstof eller et relevant omdannelsesprodukt.

Omdannelsesprodukter: alle stoffer, som dannes ved biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffet, herunder CO_3 og stoffer, som er til stede i bundne rester.

Bundne rester: »Bundne rester« repræsenterer de stoffer i jord, planter eller dyr, som efter ekstraktion bliver tilbage i den pågældende matrix, enten som moderstof eller som metabolitter/omdannelsesprodukter. Ekstraktionsmetoden må ikke bevirke væsentlige ændringer af selve stofferne eller af matrixens struktur. Bindingens art kan delvis klarlægges gennem matrixomdannende ekstraktionsmetoder og avancerede analyseteknikker. Indtil nu har man på denne måde identificeret kovalente bindinger, ionbindinger og sorptionsbindinger foruden indlejring. Sædvanligvis vil dannelse af bundne rester indebære væsentligt nedsat fysiologisk opløselighed (bioaccessibility) og biotilgængelighed (bioavailability) (12) (ændret efter IUPAC 1984 (13)).

Aerob omdannelse: reaktioner, som finder sted i tilstedeværelse af molekylært oxygen (14).

▼B

Anaerob omdannelse: reaktioner, som finder sted i fravær af molekylært oxygen (14).

Jord: en blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold og bebos af små organismer (hovedsagelig mikroskopiske). Jord kan håndteres i to tilstande:

a) uforstyrret, som den har udviklet sig med tiden, i karakteristiske lag af forskellige jordtyper

b) forstyrret, således som den sædvanligvis findes i agerjord eller når der opgraves prøver til anvendelse i denne forsøgsmetode (14).

Mineralisering: fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til CO_2 og H_2O under aerobe betingelser, og til CH_4, CO_2 og H_2O under anaerobe betingelser. Når der i denne forsøgsmetode anvendes ^{14}C-mærkede forbindelser, forstås ved mineralisering en omfattende nedbrydning, hvorunder et mærket kulstof atom oxideres under frigivelse af den pågældende mængde $^{14}CO_2$ (14).

Halveringstid: $t_{0,5}$ er den tid, der forløber, til et prøvestof er 50 % omdannet, når omdannelsen kan beskrives ved første ordens kinetik; den er koncentrationsuafhængig.

DT_{50} (Disappearance Time 50): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 50 %: følger omdannelsen ikke første ordens kinetik, er DT_{50} forskellig fra halveringstiden $t_{0,5}$.

DT_{75} (Disappearance Time 75): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 75 %.

DT_{90} (Disappearance Time 90): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 90 %.

1.3. REFERENCESTOFFER

Der skal anvendes referencestoffer til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter med spektroskopiske og/eller kromatografiske metoder.

1.4. FORSØGSMETODENS ANVENDELIGHED

Forsøgsmetoden kan anvendes på alle kemiske stoffer (umærkede eller radioaktivt mærkede), for hvilke man råder over en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Metoden er anvendelig på tungflygtige, ikke-flygtige, vandopløselige og vanduopløselige forbindelser. Metoden bør ikke anvendes på kemikalier, som er letflygtige fra jord (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke vil forblive i jorden under de her beskrevne forsøgsbetingelser.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af omdannelseshastigheden kan anvendes mærket eller umærket prøvestof. Til undersøgelse af omdannelsesveje og opstilling af massebalance skal anvendes mærket stof. ^{14}C-mærkning anbefales, men andre isotoper, f.eks. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H og ^{32}P kan også anvendes. Mærket skal så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e) ([1]). Prøvestoffets renhed skal være mindst 95 %.

Før man foretager forsøg med aerob og anaerob omdannelse i jord, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (metode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (metode A.4) og Henrys konstant

d) n-oktanol/vand fordelingskoefficient (metode A.8)

e) kemisk stabilitet i mørke (hydrolyse) (metode C.7)

f) pK_a, hvis molekylet er tilbøjeligt til at protoneres eller deprotoneres (OECD Guideline 112) (16).

Af andre nyttige oplysninger kan nævnes data vedrørende prøvestoffet toksicitet over for jordmikroorganismer (prøvemetode C.21 og C.22) (16).

Der skal foreligge analysemetoder (herunder metoder til ekstraktion og oprensning) til kvantificering og identifikation af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter.

1.6. METODENS PRINCIP

Jordprøverne behandles med prøvestoffet og inkuberes i mørke i biometerkolber eller i gennemstrømningssystemer under kontrollerede laboratoriebetingelser (ved konstant temperatur og jordfugtighed). Efter passende tidsintervaller ekstraheres jordprøverne og analyseres for moderstof og omdannelsesprodukter. Flygtige produkter indsamles ligeledes til analyse ved hjælp af passende adsorptionsanordninger. Ved at benytte ^{14}C-mærket stof kan de forskellige mineraliseringshastigheder af prøvestoffet måles gennem opsamling af den udviklede $^{14}CO_2$ og opstilling af en massebalance indbefattende dannelse af jordbundne rester.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfindingsgrad**

Ved ekstraktion og analyse af i det mindste dobbelte jordprøver umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet fås et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er blevet tilført. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer, Genfindingsgraden skal være mellem 90 % og 110 % for mærkede kemiske stoffer (8) og mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer (3).

([1]) Indeholder prøvestoffet f.eks. én ring, skal denne ring være mærket; indeholder prøvestoffet to eller flere ringe, kan separate forsøg være påkrævet for at undersøge, hvad der sker med de enkelte mærkede ringe, og for at skaffe anvendelige oplysninger om dannelse af omdannelsesprodukter.

▼B

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (heri ikke medregnet udvindingsgraden ved den indledende ekstraktion) til kvantitativ bestemmelse af prøvestof og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse på den samme ekstrakt af jord, som er inkuberet tilstrækkelig længe til at dannelse af omdannelsesprodukter har fundet sted.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukteme må ikke være over 0,01 mg-kg^{-1} jord (som prøvestof), og ikke over 1 % af den tilsatte mængde. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal ligeledes angives.

1.7.3. **Nøjagtighed af omdannelsesdata**

Gennem regressionsanalyse på bestemmelserne af prøvestoffets koncentration som funktion af tiden fås de nødvendige oplysninger om omdannelseskurvens pålidelighed og mulighed for at bestemme konfidensgrænser for halveringstiderne (for pseudo første ordens kinetik) eller DT_{50}-værdier og, i givet fald, DT_{75}- og DT_{90}-værdier.

1.8. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.8.1. **Udstyr og kemiske reagenser**

Som inkuberingssystem anvendes statiske lukkede systemer eller egnede gennemstrømningssystemer (7)(17). Eksempler på egnede gennemstrømningsapparater til jordinkubering og biometerkolber er vist i hhv. figur 1 og 2. Hver type inkuberingssystem har sine fordele og begrænsninger (7)(17).

Der kræves standardlaboratorieudstyr, specielt følgende:

— Apparater til GLC, HPLC og TLC med passende detektionssystemer til analyse af radioaktivt mærkede eller umærkede stoffer eller til omvendt isotopfortyndingsmetode

— Instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR osv.)

— Væskescintillationstæller

— Ovn til forbrænding af radioaktivt materiale

— Centrifuge

— Ekstraktionsapparat (f.eks, centrifugeglas til kold ekstraktion og Soxhlet-apparat til kontinuerlig ekstraktion med recirkulation);

— Udstyr til koncentrering af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper)

— Vandbad

— Mekanisk blandemaskine (f.eks, æltemaskine, rotationsmixer).

▼B

Anvendte kemiske reagenser kan f.eks. omfatte:

— NaOH, analytisk kvalitet. 2 $mol.dm^{-3}$, eller anden egnet base (f.eks. KOH, ethanolamin)

— H_2SO_4, analytisk kvalitet, 0,05 $mol.dm^{-3}$

— Ethylenglycol, analytisk kvalitet

— Faste absorbenter som natronkalk og polyurethancylindre

— Organiske opløsningsmidler af analytisk kvalitet, f.eks. acetone, methanol osv.

— Scintillationsvæske.

1.8.2. **Tilsætning af prøvestof**

Med henblik på tilsætning til jorden og fordeling heri kan prøvestoffet opløses i vand (demineraliseret eller destilleret) eller, når det er nødvendigt, i mindst mulige mængder acetone eller andre organiske opløsningsmidler (6), hvori prøvestoffet er tilstrækkelig opløseligt og stabilt. Det valgte opløsningsmiddel må imidlertid i den anvendte mængde ikke have væsentlig indflydelse på den mikrobielle aktivitet i jorden (jf. 1.5 og 1.9.2-1.9.3). Man bør undgå opløsningsmidler som virker hæmmende på den mikrobiologiske aktivitet, således chloroform, dichlormethan og andre halogenerede opløsningsmidler.

Prøvestoffet kan også tilsættes i fast form. f.eks. blandet i kvartssand (6) eller i en lille delprøve af prøvejorden, som er lufttørret og steriliseret. Tilsættes prøvestoffet ved hjælp af et opløsningsmiddel, skal man lade opløsningsmidlet fordampe før tilsætning af den spikede delprøve til den oprindelige usterile jordprøve.

For sædvanlige kemikalier, hvis hovedtilførselsvej til jord er gennem kloakslam/landbrug, tilsætter man først prøvestoffet til slammet, som derefter tilsættes til jordprøven. (jf. 1.9.2 og 1.9.3).

Det kan ikke anbefales at bruge formulerede produkter rutinemæssigt, For prøvestoffer med ringe opløselighed kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

1.8.3. **Jordtyper**

1.8.3.1. *Valg af jordtype*

Til fastlæggelse af omdannelsesvejen kan anvendes en repræsentativ jordtype; en sandblandet lerjord (sandy loam), siltblandet lerjord (silty loam), lerjord (loam) eller en lerblandet sandjord (loamy sand) (i henhold til FAO's og USDA's klassifikation (18)) med pH 5,5 - 8,0, organisk kulstofindhold 0,5 - 2,5 % og en mikrobiel biomasse på mindst 1 % af det totale organiske kulstofindhold anbefales (10).

Til undersøgelser af omdannelseshastigheden skal anvendes mindst tre yderligere jordtyper, som repræsenterer et udsnit af relevante jordtyper. Jordtyperne skal være forskellige hvad angår organisk kulstofindhold, pH, lerindhold og mikrobiel biomasse (10).

▼B

Alle jordtyper skal i det mindste være karakteriseret med hensyn til tekstur (% sand, % silt, % ler) (i henhold til FAO's og USDA's klassifikation (18)), pH, kationbytterkapacitet, organisk kulstofindhold, bulkdensitet og vandretentionsegenskaber ([1]) og mikrobiel biomasse (kun ved aerobe undersøgelser). Til fortolkning af resultaterne kan nærmere oplysninger om jordens egenskaber være nyttige, Til bestemmelse af jordegenskaber kan anvendes de metoder, som anbefales i henvisning (19)(20)(21)(22)(23). Til bestemmelse af mikrobiel biomasse anvendes SIR-metoden (substratinduceret respiration) (25)(26) eller alternative metoder (20).

1.8.3.2. *Indsamling, håndtering og opbevaring af jord*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet. Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, behandling med kemiske stoffer, behandling med organisk gødning og kunstgødning, tilførsel af biologisk materiale og anden forurening. Har jorden inden for de foregående fire år været behandlet med prøvestoffet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, må den ikke anvendes til omdannelsesundersøgelserne (10)(15).

Jorden skal være frisk indsamlet fra marken (fra A-horisonten eller det øverste 20 cm lag) med et indhold af jordvand, som letter sigtning. For andre jordtyper end jord fra overrislede marker bør man undgå prøvetagning under eller umiddelbart efter lange perioder (> 30 dage) med tørke, frysning eller oversvømmelse (14). Prøverne skal transporteres på en måde, som bevirker mindst mulig ændring i vandindholdet og skal opbevares mørkt med så fri adgang for luften som muligt. Hertil er en løst snøret polyethylenpose sædvanligvis velegnet.

Jorden skal behandles snarest muligt efter prøveindsamlingen. Vegetation, større jordfaunadele og sten fjernes, før jorden sigtes gennem en 2 mm si, som fjerner småsten, fauna- og planterester. Omfattende tørring og formaling af jorden før sigtning bør undgås (15).

Når prøvetagning i marken er vanskelig (jorden frossen eller snedækket), kan prøven tages fra jord, som opbevares i drivhus under plantedække (f.eks. græs eller græs/kløver). Undersøgelser med frisk indsamlet jord fra marken må stærkt foretrækkes, men skal den indsamlede og behandlede jord opbevares, før forsøget påbegyndes, må det ske under passende betingelser og i begrænset tidsrum (4-2 °C i højst 3 måneder) for at bevare den mikrobielle aktivitet ([2]). Detaljerede anvisninger for indsamling, håndtering og opbevaring af jord til anvendelse i bioomdannelsesforsøg kan findes i (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) En jordtypes vandretentionsegenskaber kan måles som markkapacitet, vandkapacitet eller vandets sugetension (pF-værdi). Forklaringer findes i bilag 1. I prøverapporten angives, om jordtypernes vandretentionsegenskaber og bulkdensitet er bestemt i uforstyrrede markprøver eller i forstyrrede (behandlede) prøver.

([2]) Nyere forskningsresultater viser, at jord fra tempererede zoner ligeledes kan opbevares ved - 20 °C i over tre måneder (28)(29) uden nævneværdigt tab i mikrobiel aktivitet.

▼B

Før den behandlede jord anvendes til dette forsøg, skal den præinkuberes for at kimene kan bringes til spiring og fjernes, og for at ligevægten i den mikrobielle metabolisme kan genetableres efter skiftet fra prøvetagnings- eller opbevaringsbetingelser til inkubationsbetingelser. Sædvanligvis vil en præinkubationseriode på mellem 2 og 28 døgn under tilnærmelsesvis samme temperatur- og fugtighedsbetingelser som under det faktiske forsøg være tilstrækkelig (15). Opbevarings- og præinkubationsperioden må tilsammen ikke være over tre måneder.

1.9. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.9.1. **Forsøgsbetingelser**

1.9.1.1. *Forsøgstemperatur*

I hele forsøgsperioden skal jordprøverne inkuberes i mørke ved en konstant temperatur, som er repræsentativ for de klimabetingelser, hvorunder benyttelse eller udledning vil finde sted. En temperatur på 20 ± 2 °C anbefales for alle prøvestoffer, som kan tilføres jorden i tempereret klima. Temperaturen skal kontrolleres.

For kemikalier, som tilføres eller udledes under koldere klimaforhold (f.eks. i nordlige lande og i efterårs- og vinterperioden) bør yderligere jordprøver desuden inkuberes ved lavere temperatur (f.eks. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Fugtindhold*

Ved omdannelsesforsøg under aerobe forhold skal jordens fugtindhold ([1]) justeres til og holdes på en pF-værdi mellem 2,0 og 2,5 (3). Jordens fugtindhold angives som masseenheder vand pr. masseenhed tør jord og bør regelmæssigt kontrolleres (f.eks. med 2 ugers mellemrum) ved vejning af inkubationskolberne, og vandtabet kompenseres ved tilsætning af vand (helst sterilfiltreret ledningsvand). Ved tilsætning af vand bør vises omhu, så man undgår eller minimerer tab af prøvestof og/eller omdannelsesprodukter ved fordampning og/eller eventuel fotodegradering.

Til omdannelsesforsøg under anaerobe forhold og under betingelser svarende til overrislet mark skal jorden vandmættes ved overrisling.

1.9.1.3. *Aerobe inkubationsbetingelser*

I gennemstrømningssystemer opretholdes aerobe betingelser ved periodisk skylning eller ved kontinuerlig ventilation med befugtet luft. I biometerkolber opretholdes luftskiftet ved diffusion.

1.9.1.4. *Sterile aerobe betingelser*

For at skaffe viden om eventuel abiotisk omdannelse af prøvestoffet kan jordprøverne steriliseres (vedr. sterilisationsmetoder henvises til henvisning (16) og (29)), behandles med sterilt prøvestof (f.eks. med en opløsning tilsat gennem et sterilfilter) og beluftes med befugtet steril luft som beskrevet i 1.9.1.3. For jord fra overrislet mark skal jord og vand steriliseres, og inkubation skal finde sted som beskrevet i 1.9.1.6.

([1]) Jorden må hverken være for våd eller for tør til at opretholde tilstrækkelig luft- og næringsstoftilførsel til jordens mikroflora. Til optimal mikrobiel vækst anbefales et fugtindhold på mellem 40 og 60 % vandholdende evne (WHC) eller fra 0,1 til 0,33 bar (6). Sidstnævnte område svarer til et pF-område på 2,0-2,5. Det typiske fugtindhold i forskellige jordtyper er angivet i bilag 2.

▼B

1.9.1.5. *Anaerobe inkubationsbetingelser*

For at etablere og opretholde anaerobe betingelser skal jorden — efter behandling med prøvestoffet og inkubation under aerobe betingelser i 30 døgn, dog højst én halveringstid eller DT_{50} — vandmættes (et vandlag på 1-3 cm), og inkubationssystemet skylles med en inaktiv gas (f.eks. kvælstof eller argon) ([1]). Forsøgsopstillingen skal gøre det muligt at måle f.eks. pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale og skal omfatte anordninger til indsamling af flygtige produkter. Systemer af biometertypen skal være lukkede for at undgå luftindtrængen ved diffusion.

1.9.1.6. *lnkubationsbetingelser svarende til overrislet mark*

For at undersøge omdannelsen i overrislede rismarker oversvømmes jorden med et vandlag på 1-5 cm, og prøvestoffet tilsættes vandfasen (9). En jorddybde på mindst 5 cm anbefales. Systemet ventileres med luft under aerobe betingelser. Den vandige fases pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale overvåges og registreres. Der kræves en præ-inkubationsperiode på mindst to uger, før omdannelsesundersøgelserne påbegyndes (se 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Forsøgets varighed*

Undersøgelserne af omdannelseshastighed og -vej bør normalt ikke strække sig over mere end 120 dage ([2]) (3)(6)(8), da der herefter må forventes at indtræffe et fald i den mikrobiologiske aktivitet med tiden i et kunstigt laboratoriesystem, som er afskåret fra naturlig fornyelse. Forsøgene kan fortsætte i længere perioder (f.eks. 6 eller 12 måneder), når det er nødvendigt for at beskrive nedbrydning af prøvestof og dannelse og nedbrydning af hovedomdannelsesprodukter (8), Eventuelle længere inkubationsperioder skal begrundes i forsøgsrapporten og skal være ledsaget af målinger af biomasse under og ved slutningen af sådanne perioder.

1.9.2. **Forsøgets udførelse**

50 til 200 g jord (på tør vægtbasis) anbringes i hver inkubationskolbe (se, figur 1 og 2 i bilag 3), og jorden behandles med prøvestoffet efter en af de i 1.8.2 beskrevne metoder. Når der anvendes organiske opløsningsmidler til påføring af prøvestoffet, fjernes disse fra jorden ved fordampning. Jorden blandes derefter grundigt med spatel og/eller ved omrystning af kolben. Finder forsøget sted under betingelser svarende til overrislet mark, skal jord og vand blandes grundigt efter tilsætning af prøvestoffet. Små alikvoter (f.eks. 1 g) af den behandlede jord analyseres for prøvestoffet til kontrol af, at fordelingen er ensartet. En alternativ metode er beskrevet nedenfor.

([1]) Aerobe betingelser er fremherskende i overjord og endda i den underliggende jord, som påvist i et EU-finansieret forskningsprojekt (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils; Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sverige). Anaerobe betingelser kan lejlighedsvis optræde, når jorden er oversvømmet efter kraftig nedbør eller når rismarker overrisles.

([2]) Aerobe undersøgelser kan afsluttes længe inden 120 døgn, forudsat at omdannelse og mineralisering er løbet fuldstændig til ende på det pågældende tidspunkt. Afslutning af forsøget er mulig efter 120 dage eller når mindst 90 % af prøvestoffet er omdannet, men kun hvis der er dannet mindst 5 % CO_2.

▼B

Behandlingsmængden skal svare til den højeste i brugsanvisningen anbefalede spredemængde af et planteskyttelsesmiddel, idet dette iblandes homogent til en passende dybde i marken (f.eks. de øverste 10 cm ([1]) jord). For kemiske stoffer, der tilføres ved bladgødskning eller påføres jorden uden iblanding, vil den mest passende dybde til beregning af den mængde kemisk stof, der skal tilsættes hver kolbe, være 2,5 cm. For kemiske stoffer, som iblandes jorden, er den mest passende dybde den iblandingsdybde, som foreskrives i brugsanvisningen. Generelt gælder, at den den mængde, der skal tilføres af et kemisk stof, bestemmes på grundlag af den mest relevante tilførselsvej; er den vigtigste tilførselsvej således gennem kloakslam, skal stoffet tilsættes slammet i en koncentration, som afspejler den forventede koncentration i slammet, og den til jorden tilsatte mængde slam skal afspejle den normale mængde slam, som landbrugsjord belastes med. Er denne koncentration ikke høj nok til, at hovedomdannelsesprodukterne kan identificeres, kan inkubation af separate jordprøver med en større tilsætningsmængde være nyttig, men man bør undgå mængder så store, at de påvirker jordens mikrobielle funktioner (jf. 1.5 og 1.8.2).

Alternativt kan en større portion (dvs. 1 til 2 kg) jord behandles med prøvestoffet, blandes grundigt i en passende blandemaskine og derefter overføres til inkubationskolberne i små portioner på 50 til 200 g (f.eks. ved hjælp af prøvedelere). Små alikvoter (f.eks. 1 g) af den behandlede jordportion analyseres for prøvestoffet til kontrol af, at fordelingen er ensartet. Denne fremgangsmåde må foretrækkes, da den giver en mere ensartet fordeling af prøvestoffet i jorden.

Desuden skal der inkuberes ubehandlede jordprøver ved samme betingelser (aerobe) som prøver behandlet med prøvestof. Disse prøver anvendes til måling af biomasse under og efter afslutning af forsøgene.

Når prøvestoffet tilføres jorden opløst i et eller flere organiske opløsningsmidler, skal jordprøverne inkuberes med samme mængde opløsningsmiddel (-midler) og ved samme betingelser (aerobe) som prøver behandlet med prøvestof. Disse prøver anvendes til måling af biomasse før, under og efter afslutning af forsøgene for at kontrollere, om opløsningsmidlerne har indvirkning på den mikrobielle biomasse.

Kolberne med behandlet jord tilsluttes enten det i figur 1 beskrevne gennemstrømningssystem eller lukkes med den i figur 2 viste absorptionskolonne (se bilag 3).

([1]) Begyndelseskoncentrationen på arealbasis beregnes af følgende udtryk:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Begyndelseskoncentrationen i jord ($mg.kg^{-1}$)

A = Spredemængde ($kg.ha^{-1}$); l = tykkelse af markjordlaget (m):

d = tør bulkdensitet af jorden ($kg.m^{-3}$).

Som tommelfingerregel resulterer en spredemængde på 1 $kg.ha^{-1}$ i en jordkoncentration på ca. 1 $mg.kg^{-1}$ i et 10 cm tykt lag (idet bulkdensiteten er sat til 1 $g.cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Prøvetagning og måling**

Ved de respektive tidsintervaller udtages et par inkubationskolber, og jordprøverne ekstraheres med passende opløsningsmidler af forskellig polaritet og analyseres for prøvestof og/eller omdannelsesprodukter. I en veltilrettelagt undersøgelse er der tilstrækkeligt med kolber til, at der kan bruges to kolber ved hver prøvetagning. Endvidere udtages absorptionsopløsninger eller faste absorbenter med forskellige tidsintervaller (i den første måned med 7-døgns intervaller, efter én måned med 17-døgns intervaller) under og efter inkubationen af hver jordprøve og analyseres for flygtige produkter. Derudover skal der indgå jordprøver udtaget direkte efter tilsætning (0-dages prøve) i mindst 5 forskellige prøvetagningspunkter. Tidsintervallerne vælges sådan, at mønsteret for nedbrydning af prøvestoffet og for omdannelsesprodukternes dannelse og nedbrydning kan fastlægges (f.eks. ved 0. 1, 3, 7 dage; 2, 3 uger; 1, 2, 3 måneder osv.).

Når der bruges ^{14}C-mærket prøvestof, bliver den ikke-ekstraherbare radioaktivitet kvantificeret ved forbrænding, og der opstilles en massebalance for hvert prøvetagningsinterval.

Ved inkubation under anaerobe forhold og med overrisling af jorden kan jord- og vandfasen enten sammen analyseres for prøvestof og omdannelsesprodukter, eller faserne kan adskilles ved filtrering eller centrifugering før ekstraktion og analyse.

1.9.4. **Frivillige prøver**

Det kan være nyttigt at foretage yderligere forsøg under aerobe, ikke-sterile betingelser ved andre temperaturer og jordfugtigheder for at belyse temperaturens og jordfugtighedens indflydelse på omdannelseshastigheden af et prøvestof og/eller dets omdannelsesprodukter i jord.

Yderligere karakterisering af ikke-ekstraherbar radioaktivitet kan søges foretaget f.eks. med superkritisk væskeekstraktion.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Mængden af prøvestof, omdannelsesprodukter, flygtige stoffer (kun i %) og ikke ekstraherbart stof angives i % af den tilførte begyndelseskoncentration og, i givet fald, i $mg.kg^{-1}$ jord (på tør vægtbasis) for hvert prøvetagningsinterval. For hvert prøvetagningsinterval opstilles en massebalance i procent af den tilførte begyndelseskoncentration. En grafisk fremstilling af prøvestoffets koncentration mod tiden giver mulighed for bestemmelse af dets omdannelseshalveringstid eller DT_{50}. De vigtigste omdannelsesprodukter skal identificeres og deres koncentration ligeledes afbildes grafisk mod tiden for at vise deres dannelses- og nedbrydningshastighed. Ved »vigtigste omdannelsesprodukter« forstås dem, der på noget tidspunkt i løbet af undersøgelsen repræsenterer ≥ 10 % af den tilførte mængde.

De opsamlede flygtige produkter giver et vist fingerpeg om prøvestoffets og omdannelsesprodukterne potentielle flygtighed fra jord.

▼B

Der foretages en mere præcis bestemmelse af halveringstider eller DT_{50}-værdier og, i givet fald. DT_{75}- og DT_{90}-værdier, ved beregning med passende kinetiske modeller. I rapporten angives værdierne af halveringstider og DT_{50} sammen med beskrivelsen af den anvendte model, reaktionsordenen og determinationskoefficienten (r^2). Første ordens kinetik antages at være gældende, medmindre $r^2 < 0{,}7$. Når det er hensigtsmæssigt, anvendes beregningerne også på hoved-omdannelsesprodukterne. Eksempler på passende modeller er beskrevet i henvisning (31) til (35).

For kinetikforsøg ved forskellige temperaturer beskrives omdannelses-hastighederne som funktion af temperaturen inden for det eksperimentelle temperaturområde med brug af Arrhenius' ligning i formen:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

hvor ln A og B er regressionskonstanter givet ved henholdsvis skæringspunkt og hældning af den bedst tilnærmede linje dannet ved lineær regression af ln k mod 1/T, idet k er hastighedskonstanten og T temperaturen i Kelvin. Man må være opmærksom på, at Arrchenius-ligningen kun er gyldig inden for et begrænset temperatur-område, når omdannelsen sker ved mikrobiel aktivitet.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Skønt forsøgene finder sted i et kunstigt laboratoriesystem, kan man ved hjælp af resultaterne bestemme både prøvestoffets omdannelses-hastighed og den hastighed, hvormed omdannelsesprodukterne dannes og nedbrydes under feltbetingelser (36)(37).

Ved at undersøge omdannelsesvejen for et prøvestof får man oplysninger om, hvordan det tilførte stof undergår strukturændringer i jorden gennem kemiske og mikrobielle reaktioner.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende:

Prøvestof:

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se 1.5)

— renhed (urenheder) af prøvestoffet

— det mærkede kemiske slofs radiokemiske renhed og, når del er hensigtsmæssigt, specifikke aktivitet

Referencestoffer:

— kemisk navn og struktur for de referencestoffer, som er anvendt til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter

Prøvejordtyper:

— enkeltheder vedrørende indsamlingsstedet

— dato og fremgangsmåde for udtagelse af jordprøven

▼B

— jordtypernes egenskaber, således pH, organisk kulstofindhold, tekstur, (% sand, % silt, % ler), kationbytterkapacitet bulkdensitet, vandretentionsegenskaber og mikrobiel biomasse

— opbevaringsvarighed og -betingelser (hvis jorden har været opbevaret)

Omstændigheder ved forsøget:

— dato for forsøgenes udførelse

— mængde prøvestof tilført

— anvendte opløsningsmidler og metoden, med hvilken prøvestoffet er tilført

— vægtmængde jord, som indledende er behandlet og hvoraf der er udtaget prøver til analyse med de fastlagte intervaller

— beskrivelse af det anvendte inkubationssystem

— luftgennemstrømningshastigheder (kun for gennemstrømningssystemer)

— temperatur af forsøgsopstillingen

— jordens fugtindhold under inkuberingen

— mikrobiel biomasse før, under og efter aerobe forsøg

— pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale før, under og efter forsøg under anaerobe forhold og med overrislet jord

— ekstraktionsmetode(r)

— metoder til kvantificering og identifikation af prøvestoffet og dets hovedomdannelsesprodukter i jord og absorbenter

— antal gentagelser og antal kontroller

Resultater

— resultat af bestemmelse af mikrobiel aktivitet

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— genfindingsgrad (% værdier for en gyldig undersøgelse er angivet i 1.7.1)

— tabeller over resultater, angivet som % af den tilførte begyndelsesdosis, og, i givet fald, som mg. kg^{-1} jord (på tør vægtbasis)

— massebalance før, under og efter forsøgene

— beskrivelse af ikke-ekstraherbar (bunden) radioaktivitet eller rester i jord

— kvantificering af udledt CO_2 og andre flygtige forbindelser

— kurver over koncentrationen i jord som funktion af tiden, dels for prøvestoffet, dels, i givet fald, for de vigtigste omdannelsesprodukter

— halveringstid eller DT_{50}, DT_{75} og DT_{90}, dels for prøvestoffet, dels, i givet fald, for de vigtigste omdannelsesprodukter, med angivelse af konfidensgrænser

▼B

— bestemmelse af den abiotiske nedbrydningshastighed under sterile betingelser

— en vurdering af omdannelseskinetikken for prøvestoffet og, i givet fald, hovedomdannelsesprodukterne

— formodede omdannelsesveje, når det er relevant

— diskussion og fortolkning af resultaterne

— rådata (dvs. eksempler på kromatogrammer, eksempler på beregning af omdannelseshastigheder, og anvendte metoder til identifikation af omdannelsesprodukter).

4. **HENVISNINGER**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III. Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling . Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schaehtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments, In Pesticide Effects on Soil Microflora, L. Somerville. M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment; Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality. 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996), Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R, (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, DA, Hamaker, J.W., Mcikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In »Environmental Dynamics of Pesticides«. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V, (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II, Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. 1. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci.Technol. 24. 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Bilag 1

VANDTENSION, MARKKAPACITET OG VANDHOLDENDE EVNE [1]

Højde af vandsøjle [cm]	pF [a]	bar [b]	Bemærkninger
10^7	7	10^4	Tør jord
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Visnegrænse
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Område for Markkapacitet [d]
10^2	2	0,1	
19	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Vandholdende evne (tilnærmet)
1	0	0,001	Vandmættet jord

[a] pF = logaritmisk angivelse af cm vandsøjle.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Svarende til et omtrentligt vandindhold på 10 % i sand, 35 % i lerjord og 45 % i ler.
[d] Markkapaciteten er ikke konstant, men varierer alt efter jordtypen mellem pF 1,5 og 2,5.

Vandpotentialet måles i cm vandsøjle eller i bar. På grund af sugetensionens store variationsområde angives denne simpelthen som pF-værdien, som svarer til logaritmen til værdien i cm vandsøjle.

Markkapaciteten er den mængde vand. som en naturlig jord kan tilbageholde mod tyngdekraften 2 døgn efter længerevarende regn eller efter tilstrækkelig kunstvanding. Den bestemmes i uforstyrret jord in situ i marken. Målingen er således ikke anvendelig på laboratorieprøver af forstyrret jord. Markkapaciteten bestemt i forstyrret jord kan udvise store systematiske afvigelser.

Den vandholdende evne (WHC) bestemmes i laboratoriet med uforstyrret og forstyrret jord ved at mætte en jordsøjle med vand ved kapillartransport. Den er specielt nyttig til forstyrret jord og kan være indtil 30 % større end markkapaciteten (1). Den er endvidere lettere al bestemme eksperimentelt end pålidelige værdier af markkapaciteten.

Noter

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Bilag 2

FUGTINDHOLD I JORD (G VAND PR. 100 G TØR JORD) FOR FORSKELLIGE JORDTYPER FRA FORSKELLIGE LANDE

Jordtype	Land	Fugtindhold i jord ved		
		Vandholdende evne (WHC) ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Sand	Tyskland	28,7	8,8	3,9
Lerblandet sand	Tyskland	50,4	17,9	12,1
Lerblandet sand	Schweiz	44,0	35,3	9,2
Siltler	Schweiz	72,8	56,6	28,4
Lerjord	Brasilien	69,7	38,4	27,3
Lerjord	Japan	74,4	57,8	31,4
Sandblandet lerjord	Japan	82,4	59,2	36,0
Siltler	USA	47,2	33,2	18,8
Sandblandet lerjord	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Vandholdende evne.

▼B

Bilag 3

Figur 1

Eksempel på gennemstrømningsapparat til undersøgelser af omdannelsen af kemikalier i jord ([1]) ([2])

1: nåleventil

2: gasvaskeflaske indeholdende vand

3: ultramembran (kun sterile betingelser), porestørrelse 0,2 µm

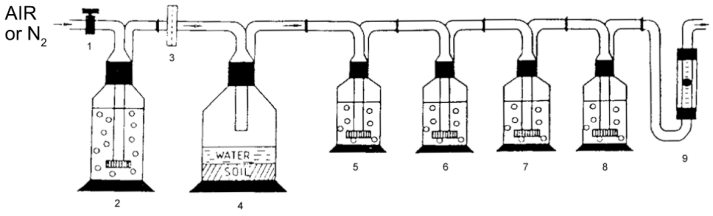
4: kolbe til undersøgelse af jordens metabolisme (kun vandfyldt under anaerobe forhold og i overrislet jord)

5: udskiller med ethylenglycol til flygtige organiske forbindelser

6: udskiller med svovlsyre til flygtige alkaliske forbindelser

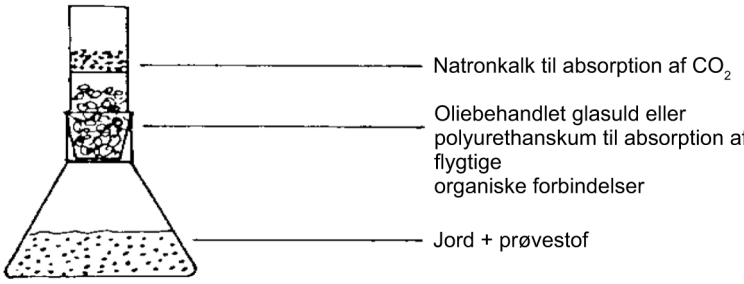
7, 8: udskiller med natriumhydroxid til CO_2 og andre flygtige sure stoffer

9: flowmeter



Figur 2

Eksempel på kolbe af biometertypen til undersøgelse af omdannelsen af kemiske stoffer i jord ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (RJ. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I AKVATISKE SEDIMENTSYSTEMER

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 308 (2002).

1.1. INDLEDNING

Kemiske stoffer kan blive tilført lave eller dybe overfladevande gennem direkte tilledning, spredning af aerosoler, afstrømning, afløb, affaldsbortskaffelse, spildevand fra industri, husholdning eller landbrug samt atmosfærisk deposition. Den her beskrevne laboratoriemetode er bestemt til vurdering af aerob og anaerob omdannelse af organisk-kemiske stoffer i akvatiske sedimentsystemer. Den er baseret på eksisterende Guidelines (1)(2)(3)(4)(5)(6). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype i Belgirate, Italien, i 1995 (7) enedes man specielt om antal og art af de sedimenter, som skal anvendes i dette forsøg. Workshoppen udsendte desuden anbefalinger for indsamling, håndtering og opbevaring af sedimentprøver, baseret på ISO-vejledningen (8). Sådanne undersøgelser er nødvendige for kemiske stoffer, som anvendes direkte i vandmiljøet eller som må påregnes at nå frem til vandmiljøet ad ovennævnte veje.

I naturlige akvatiske sedimentsystemer hersker der ofte aerobe forhold i den øvre vandfase. Det overfladiske sedimentlag kan enten være aerobt eller anaerobt, mens den dybere del af sedimentet sædvanligvis er anaerob. For at tage alle disse muligheder i betragtning beskrives i dette dokument både aerobe og anaerobe forsøg. Det aerobe forsøg simulerer en aerob vandsøjle over et aerobt sedimentlag, som befinder sig over en anaerob gradient. Det anaerobe forsøg simulerer et fuldstændig anaerobt vandsedimentsystem. Hvis omstændighederne gør det nødvendigt at afvige væsentligt fra disse anbefalinger, f.eks. ved at bruge intakte sedimentkerner eller sedimenter, som kan have været udsat for prøvestoffet, foreligger der andre metoder til dette formål (9).

1.2. DEFINITIONER

Der skal i alle tilfælde anvendes SI-enheder.

Prøvestof: et vilkårligt stof, hvad enten det er moderstof eller et relevant orndannelsesprodukt.

Omdannelsesprodukter: alle stoffer, som dannes ved biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffer, herunder CO_2 og bundne rester.

Bundne rester: »Bundne rester« repræsenterer de stoffer i jord, planter eller dyr, som efter ekstraktion persisterer i den pågældende matrix, enten som moderstof eller som metabolitter/omdannelsesprodukter. Ekstraktionsmetoden må ikke bevirke væsentlige ændringer af selve stofferne eller af matrixens struktur. Bindingens art kan delvis klarlægges gennem matrixomdannende ekstraktionsmetoder og avancerede analyseteknikker. Indtil nu er der på denne måde identificeret kovalente bindinger, ionbindinger og sorptionsbindinger foruden indlejring. Sædvanligvis vil dannelse af bundne rester medføre væsentligt nedsat fysiologisk opløselighed (bioaccessibility) og biotilgængetighed (bioavailability) (10) (ændret efter IUPAC 1984 (11)).

▼B

Aerob omdannelse: (oxiderende): reaktioner, som finder sted i tilstedeværelse af molekylært oxygen (12).

Anaerob omdannelse: reaktioner, som finder sted i fravær af molekylært oxygen (12).

Naturligt vand: overfladevande udtaget fra damme, floder, vandløb osv.

Sediment: en blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold, Det afsættes af naturligt vand og danner grænseflade til dette vand.

Mineralisering; fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til CO_2 og H_2O under aerobe betingelser, og til CH_4, CO_2 og H_2O under anaerobe betingelser. Når der i forbindelse med denne forsøgsmetode anvendes radioaktivt mærkede forbindelser, forstås ved mineralisering en vidtgående nedbrydning af molekylet, hvorunder et mærket kulstofatom oxideres eller reduceres under frigivelse af den pågældende mængde af henholdsvis $^{14}CO_2$ og $^{14}CH_4$.

Halveringstid: $t_{0,5}$ er den tid, der forløber, til et prøvestof er 50 % omdannet, når omdannelsen kan beskrives ved første ordens kinetik; den er uafhængig af begyndelseskoncentrationen.

DT_{50} (Disappearance Time 50): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 50 %.

DT_{75} (Disappearance Time 75): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 75 %.

DT_{90} (Disappearance Time 90): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 90 %.

1.3. REFERENCESTOFFER

Til identifikation og kvantitativ bestemmelse af omdannelsesprodukter med spektroskopiske og kromatografiske metoder skal anvendes referencestoffer.

1.4. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af omdannelseshastigheden kan anvendes umærket eller isotopmærket prøvestof, men radioaktivt mærket stof må foretrækkes. Til undersøgelse af omdannelsesveje og opstilling af massebalance skal anvendes mærket stof. ^{14}C-mærkning anbefales, men andre isotoper, f.eks. ^{13}C, ^{15}N, H og "P, kan også anvendes. Mærket skal så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e) ([1]). Prøvestoffets kemiske og/eller radiokemiske renhed skal være mindst 95 %.

Før man udfører et forsøg, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (metode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (metode A.4) og Henrys konstant

([1]) Indeholder prøvestoffet f.eks. én ring, skal denne ring være mærket; indeholder prøvestoffet to eller flere ringe, kan separate forsøg være nødvendige for at undersøge de enkelte mærkede ringes skæbne og for at få anvendelige oplysninger om dannelse af omdannelsesprodukter.

▼B

d) n-oktanol/vand fordelingskoefficient (metode A.8)

e) adsorptionskoefficient (K_d, K_f eller, i givet fald, K_{oc} (metode C. 18)

f) hydrolyse (metode C.7)

g) syredissociationskonstant (pK_a) (OECD Guideline 112) (13)

h) prøvestoffets kemiske struktur og placeringen af eventuel isotopmærkning.

Bemærkning; Den temperatur, ved hvilken disse målinger har fundet sted, skal angives.

Af andre nyttige oplysninger kan nævnes data vedrørende prøvestoffet toksicitet over for mikroorganismer, data vedrørende umiddelbar og/eller naturlig bionedbrydelighed og data vedrørende aerob og anaerob omdannelse i jord.

Der skal foreligge analysemetoder (herunder metoder til ekstraktion og oprensning) til identifikation og kvantitativ bestemmelse af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter i vand og i sediment (se 1.7.2).

1.5. FORSØGSMETODENS PRINCIP

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes et aerobt og et anaerobt akvatisk sedimentsystem (se bilag 1), som giver mulighed for:

i) måling af prøvestoffets omdannelseshastighed i et vand-sediment system

ii) måling af prøvestoffets omdannelseshastighed i sedimentet

iii) måling af mineraliseringshastigheden for prøvestoffet og/eller dets omdannelsesprodukter (når der anvendes ^{14}C-mærket prøvestof)

iv) identifikation og kvantitativ bestemmelse af omdannelsesprodufeter i vand- og sedimentfaser, herunder massebalance (når der anvendes mærket prøvestof)

v) måling af fordelingen af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter mellem de to faser under inkubation i mørke (for at undgå f.eks. algevækst) ved konstant temperatur, Halveringstid. DT_{50}, DT_{75} og DT_{90} bestemmes, når data berettiger det, men bør ikke ekstrapoleres ud over forsøgsperioden (se 1.2).

Til både aerobe og anaerobe forsøg kræves mindst to sedimenter og de tilhørende vande (7). I visse tilfælde kan det dog være nødvendigt at anvende flere end to akvatiske sedimenter, f.eks. når det kemiske stof kan optræde i ferskvands- og/eller marint miljø.

▼B

1.6. FORSØGSMETODENS ANVENDELIGHED

Forsøgsmetoden kan anvendes på alle kemiske stoffer (umærkede eller mærkede), til hvilke man råder over en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Metoden kan anvendes på tungflygtige, ikke-flygtige, vandopløselige og tungtopløselige forbindelser. Metoden bør ikke anvendes på kemiske stoffer, som er letflygtige fra vand (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke vil forblive i vand og/eller sediment under de her beskrevne forsøgsbetingelser.

Metoden er hidtil anvendt til undersøgelse af omdannelsen af kemiske stoffer i ferske vande og sedimenter, men kan i princippet også anvendes på flodmundingssystemer/marine systemer. Den er ikke egnet til simulering af betingelserne i strømmende vand (f.eks floder) eller i det åbne hav.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfindingsgrad**

Ved ekstraktion og analyse af i det mindste dobbelte vand- og sedimentprøver umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet fås et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er blevet tilført. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer (når der bruges mærket stof). Genfindingsgraden skal være mellem 90 % og 110 % for mærkede kemiske stoffer (6) og mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer.

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (heri ikke medregnet udvindingsgraden ved den indledende ekstraktion) til kvantitativ bestemmelse af prøvestof og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse på den samme ekstrakt af vand- eller sedimentprøverne, efter at disse er inkuberet tilstrækkelig længe til, at dannelse af omdannelsesprodukter har fundet sted.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukterne må ikke være over 0,01 mg kg^{-1} i vand eller sediment (som prøvestof) og ikke over 1 % af den startmængde, der er tilsat prøvesystemet. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal angives.

1.7.3. **Nøjagtighed af omdannelesdata**

Gennem regressionsanalyse på bestemmelserne af prøvestoffets koncentration som funktion af tiden fås relevante oplysninger om omdannelseskurvens nøjagtighed samt mulighed for at fastlægge konfidensgrænser for halveringstiderne (når der gælder pseudo første ordens kinetik) eller DT_{50}-værdier, og i givet fald DT_{75}- og DT_{90}-værdier.

1.8. BESKRIVELSE AF METODEN

1.8.1. **Prøvesystem og apparatur**

Til forsøget skal anvendes glasbeholdere (f.eks. flasker, centrifugeglas), medmindre de indledende data (således n-oktanol-vand fordelingskoefficient, sorptionsdata osv.) viser, at prøvestoffet kan adhærere til glas, i hvilket tilfælde det kan blive nødvendigt at benytte et alternativt materiale (som Teflon). Når prøvestoffet vides at adhærere til glas, kan problemet afhjælpes ved hjælp af eneller flere af følgende metoder:

▼B

— bestemmelser a fden masse prøvestof og omdannelsesprodukter, som sorberes på glas

— vask af alt glasapparatur med opløsningsmiddel ved forsøgets afslutning

— anvendelse af formulerede produkter (se også 1.9.2)

— brug af øget mængde co-solvent ved tilsætning af prøvestof til systemet; anvendes co-solvent, må det ikke bevirke solvolyse af prøvestoffet.

Eksempler på typiske prøveopstillinger, dvs. gennemstrømningssystemer og biometersystemer, er vist i hhv, bilag 2 og 3 (14). Andre anvendelige inkubationssystemer er beskrevet i henvisning (15). Forsøgsopstillingen skal give mulighed for udskiftning af luft eller kvælstof og indsamling af flygtige produkter, Forsøgsopstillingen skal være dimensioneret således, at den opfylder de krav, der stilles af forsøget (jf. 1.9.1). Udluftning kan enten ske ved let gennembobling eller ved at der ledes luft eller kvælstof hen over vandoverfladen. I sidstnævnte tilfælde kan forsigtig omrøring ovenfra være nødvendig for at opnå bedre fordeling af ilt eller kvælstof i vandet, Der må ikke anvendes CO_2-fri luft, da det kan medføre stigning i vandets pH. I begge tilfælde bør forstyrrelse af sedimentet så vidt muligt undgås. Tungflygtige kemiske stoffer skal testes i et biometer-system med forsigtig omrøring af vandoverfladen. Lukkede kar med headspace af enten atmosfærisk luft eller kvælstof og indvendige glas til opsamling af flygtige produkter kan ligeledes anvendes (16). Ved den aerobe prøve kræves regelmæssig udskiftning af headspace-gassen for at kompensere for biomassens iltforbrug.

Egnede udskillere til flygtige opsamlingsprodukter kan være, men er ikke begrænset til en 1 M opløsning af kaliumhydroxid eller natriumhydroxid til udskillelse af kuldioxid ([1]) og ethylenglycol, ethanolamtn eller 2 % paraffin i xylen til organiske forbindelser. Flygtige stoffer, som dannes under anaerobe forhold, således methan, kan f.eks, opsamles med molekylsi, Sådanne flygtige stoffer kan f.eks, forbrændes til CO_2 ved, at gassen ledes gennem et kvartsrør fyldt med CuO ved en temperatur på 900 ^{o}C, og den dannede CO_2 opsamles i en absorber med alkali (17).

Der kræves laboratorieudstyr til kemisk analyse af prøvestoffet og omdannelsesprodukter (f.eks. ved gasvæskekromatografi (GLC), high performance væskekromatografi (HPLC), tyndtlagskromatografi (TLC), massespektroskopi (MS), gaskromatografi-massespektroskopi (GC-MS), væskekromatografi-massespektroskopi (LC-MS), kernemagnetisk resonans (NMR) mv.), herunder detektionssystemer for radioaktivt mærkede eller umærkede kemiske stoffer. Når radioaktivt mærket stof anvendes, skal der desuden bruges en væskescintillationstæller og en forbrændingsovn (til forbrænding af sedimentprøve før analyse af radioaktivitet).

Herudover skal der efter behov bruges øvrigt standardlaboratoneudstyr til fysisk-kemisk og biologisk bestemmelse (se tabel 1, 1.8.2.2), glasapparatur, kemikalier og reagenser.

([1]) Da sådanne alkaliske absorptionsvæsker også optager kuldioxiden i ventilationsluften og den, der er dannet ved respiration i aerobe forsøg, må de udskiftes regelmæssigt for at de ikke skal blive mættet og tabe absorptionsevnen.

▼B

1.8.2. **Type og antal akvatiske sedimenter**

Prøvetagningsstedet skal vælges i henhold til formålet med det pågældende forsøg. Ved valg af prøvetagningssted må der tages hensyn til oplysninger om eventuel tidligere tilførsel fra landbrug, industri eller husholdninger til vandene opstrøms for prøvearealet. Har sedimenterne inden for de foregående fire år været forurenet med prøvestoffet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, bør de ikke anvendes.

1.8.2.1. *Valg af sediment*

Til aerobe forsøg anvendes normalt to sedimenter (7). De to valgte sedimenter skal være forskellige med hensyn til organisk kulstofindhold og tekstur. Det ene sediment skal have højt organisk kulstofindhold (2,5-7,5 %) og fin tekstur, det andet skal have lavt organisk kulstofindhold (0,5-2,5 %) og grov tekstur. Forskellen i organisk kulstofindhold skal normalt være mindst 2 %. Ved »fin tekstur« forstås, at indholdet af [ler + silt] ([1]) > 50 %, og ved »grov tekstur« forstås, at indholdet af [ler + silt| < 50 %. Forskellen i indholdet af [ler + silt] i de to sedimenter bør normalt være mindst 20 %. I tilfælde, hvor et kemisk stof også kan blive ført til marine vande, skal mindst det ene vandsedimentsystem være af marin oprindelse.

Til det rent anaerobe forsøg tages to sedimentprøver (sammen med de tilhørende vande) fra det anaerobe område af overfladevandområderne (7). Der drages omsorg for, at ilten ikke får adgang til sediment- eller vandfasen under håndtering og transport.

Også andre parametre kan være vigtige ved valg af sedimenter og må tages i betragtning i de enkelte tilfælde. For eksempel vil sedimenternes pH-område være vigtig ved testning af stoffer, hvis omdannelse og/eller sorption kan være pH-afhængig. pH-afhængig sorption kan afspejle sig i prøvestoffets pK_a-værdi.

1.8.2.2. *Karakterisering af vand-sediment prøver*

I nedenstående tabel er angivet de nøgleparametre, der skat måles og rapporteres (med henvisning til den anvendte metode) for både vand og sediment, samt på hvilket trin i forsøget disse parametre skal bestemmes. Til orientering er metoder til bestemmelse af de pågældende parametre givet i henvisning (18)(19)(20)(21).

Derudover kan der i det enkelte tilfælde være behov for måling og af andre parametre (f.eks, for ferskvand; partikler, alkalinitet, hårdhed, ledningsevne, NO_3/PO_4 (forhold og enkeltværdier); for sedimenter: kationbytrerkapacitet, vandholdende evne, karbonat, total kvælstof og fosfor; og for marine systemer: salinitet). Analyse af sedimenter og vand for nitrat, sulfat, biotilgængeligt jern og eventuelle andre elektronacceptorer kan desuden være nyttig til vurdering af redoxforholdene, specielt i forbindelse med anaerob omdannelse.

([1]) [Ler + silt] er den mineralfraktion af sedimentet, hvis partikelstørrelse er < 50 µm.

▼B

Måling af parametre til karakterisering af vand-sediment prøver(7)(22)(23)

Parameter	Forsøgsfase					
	mark prøvetag-ning	efter hånd-teri ng	start på akklimatise ring	start på forsøg	under forsøg	forsøgets slutning
Vand						
Oprindelse/kilde	X					
Temperatur	X					
pH	X		X	X	X	X
totalt organisk kulstof (TOC)			X	X		X
O_2-koncentration*	X		X	X	X	X
Redoxpotentiale*			X	X	X	X
Sediment						
Oprindelse/kilde	X					
Lagdybde	X					
pH		X	X	X	X	X
Partikelstørrelsesfordeling		X				
totalt organisk kulstof (TOC)		X	X	X		X
Mikrobiel biomasse (*)		X		X		X
Redoxpotentiale (**)	Observation (farve/lugt)		X	X	X	X

(*) Nyere forskning har vist, at målinger af vandets iltindhold og redoxpotentiale hverken har mekanistisk eller prædiktiv værdi med hensyn til mikrobielle populationers vækst og udvikling i overfladevande (24)(25). Bestemmelse af biokemisk iltforbrug (BOD, ved prøvetagning i marken, ved forsøgets start og slutning) og koncentrationen af mikro- og makronæringsstofferne Ca, Mg og Mn (ved forsøgets start og slutning) i vand samt måling af totalt kvælstof og totalt fosfor i sedimenter (ved prøvetagning i marken, ved forsøgets start og slutning) kan være mere velegnede som værktøjer til forståelse og vurdering aerobe biomdannelseshastigheder og -veje.

(**) Metoder baseret på mikrobiel respirationshastighed (26), rygning (27) eller kolonitælling (f.eks. bakterier, aktinomyceter, svampe og totalkolonier) til aerobe forsøg; methandannelseshastigheden ved anaerobe forsøg.

1.8.3. **Indsamling, håndtering og opbevaring**

1.8.3.1. *Indsamling*

Udtagning af prøver af sediment skal ske i overensstemmelse med udkastet til ISO-vejledningen for prøvetagning af bundsediment (8). Sedimentprøver skal tages fra hele den øverste 5 til 10 cm dybe del af sedimentlaget. Det tilhørende vand skal indsamles fra samme areal eller lokalitet og på samme tidspunkt som sedimentet. Til det anaerobe forsøg skal prøven af sedimentet og det tilhørende vand udtages og transporteres uden adgang af ilt (28) (jf. 1.8.2.1). I litteraturen beskrives nogle prøvetagningsanordninger(8)(23).

▼B

1.8.3.2. *Håndtering*

Sedimentet adskilles fra vandet ved filtrering og vådsigtes gennem en 2 mm sigte med overskud af vand fra indsamlingsstedet, og det overskydende vand herfra kasseres. Derefter blandes kendte mængder sedimenter og vand i det ønskede forhold (jf, 1.9.1) i inkubationsflasker og forberedes til akklimatiseringsperioden (jf. 1.8.4). Til det anaerobe forsøg skal al håndtering ske under udelukkelse af ilt (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3. *Opbevaring*

Brug af frisk udtagede prøver af sediment og vand må stærkt anbefales, men er opbevaring nødvendig, skal sediment og vand sigtes som beskrevet ovenfor og opbevares sammen under vand (et 6-10 cm vandlag), i mørke ved 4 ± 2 °C ([1]) i højst 4 uger (7)(8)(23). Prøver, som skal anvendes til aerobe forsøg, skal opbevares med fri luftadgang (f.eks i åbne beholdere), hvorimod prøver til anaerobe forsøg opbevares under udelukkelse af ilt. Under transport og opbevaring må ikke forekomme frysning af sediment og vand eller udtørring af sedimentet.

1.8.4. **Klargøring af prøverne af sediment/vand til forsøget**

Før prøvestoffet tilsættes, skal der hengå en akkltmatiseringsperiode, hvor hver sediment/vandprøve er anbragt i den inkubationsbeholder, som skal bruges i hovedforsøget, og akklimatiseringen skal finde sted under nøjagtig samme betingelser som ved inkubationen under forsøget (se 1.9.1). Akklimatiseringsperioden skal svare til den tid, systemet er om at nå en rimelig stabilitet, således som det ses af pH, oxygenkoncentrationen i vandet, redoxpotentiale af sediment og vand, og den makroskopiske adskillelse af faserne, Akklimatiseringen skal normalt vare mellem en og to uger og bør ikke overstige fire uger. Resultaterne af de bestemmelser, der er foretaget i denne periode, skal angives i rapporten.

1.9. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.9.1. **Forsøgsbetingelser**

Forsøget udføres i inkubationsapparat (se 1.8.1) med et vand:sediment volumenforhold mellem 3:1 og 4:1 og et sedimentslag 2,5 cm (± 0,5 cm). Det anbefales at bruge mindst 50 g sediment (på tørvogtsbasis) per inkubationsbeholder.

Forsøget udføres i mørke ved konstant temperatur mellem 10 og 30 °C, En temperatur på (20 ± 2) °C er passende. Når det er hensigtsmæssigt, kan man i de enkelte tilfælde overveje en yderligere lav temperatur (f.eks. 10 °C), alt efter hvilke oplysninger forsøget skal give. Inkubationstemperaturen skal overvåges og rapporteres.

([1]) Nyere undersøgelser har vist. at der ved opbevaring ved 4 °C kan indtræde et fald i sedimentets organiske kulstofindhold, muligvis med nedsat mikrobiel aktivitet til følge (34).

▼B

1.9.2. **Behandling og tilsætning af prøvestoffet**

Der anvendes én prøvekoncentration af det kemiske stof [1]. For plantebeskyttelsesmidler, som tilføres vandområderne direkte, anvendes som maksimal spredemængde den på mærkaten angivne maksimumsdosering, beregnet på grundlag af overfladearealet af vandet i prøvekarret. I alle andre tilfælde beregnes den anvendte koncentration på grundlag af prognoser baseret på de udledte mængder. Der skal drages omsorg for at sikre, at den tilførte mængde prøvestof er tilstrækkelig til at give mulighed for at karakterisere dets omdannelsesvej og omdannelsesprodukternes dannelse og nedbrydning. Det kan være nødvendigt at tilsætte højere doser (f.eks. 10 gange) i tilfælde, hvor stoffets koncentrationer ved forsøgets begyndelse er nær detektionsgrænsen og/eller hvis de vigtigste omdannelsesprodukter ikke let kan detekteres, når de optræder i en mængde på 10 % af den af prøvestoffet tilførte mængde. Anvendes højere testkoncentrationer, må disse dog ikke have nævneværdig ugunstig virkning på den mikrobielle aktivitet af vand-sediment systemet. For at opnå konstant prøvestofkoncentration i prøvekar af forskellige dimensioner vil det eventuelt blive fundet hensigtsmæssigt at korrigere den tilførte stofmængde på grundlag af dybden af vandsøjlen i karret i forhold til vanddybden i marken (som sættes til 100 cm, men andre dybder kan anvendes). Et eksempel på beregningsmåden er givet i bilag 4.

Ideelt skal prøvestoffet tilsættes prøvesystemets vandfase som vandig opløsning. Når det er uomgængelig nødvendigt, kan der bruges små mængder vandblandbare opløsningsmidler (som f.eks, acetone eller ethanol) til at tilføre og fordele prøvestoffet, men den tilsatte mængde må ikke udgøre over 1 % v/v eller have ugunstig virkning på den mikrobielle aktivitet af prøvesystemet. Den vandige opløsning af prøvestoffet skal fremstilles med omhu — det kan være hensigtsmæssigt at anvende en generatorsøjle og forblanding for at sikre fuldstændig homogenitet. Efter tilsætning af den vandige opløsning til prøvesystemet anbefales, at vandfasen blandes forsigtigt, så sedimentet forstyrres mindst muligt.

Det kan normalt ikke anbefales at anvende det færdigformulerede produkt, da indholdsstofferne i formuleringen kan påvirke prøvestoffets og/eller omdannelsesprodukternes fordeling mellem vand- og sedimentfase. For prøvestoffer med ringe opløselighed i vand kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

Antallet af inkubationsbeholdere afhænger af antal prøvetagningstidspunkter (se 1.9.3). Der skal indgå tilstrækkeligt mange prøvesystemer til, at der kan ofres to systemer for hvert prøvetagningstidspunkt. Anvendes der kontrolenheder med hvert akvatisk sedimentsystem, skal disse ikke behandles med prøvestof. Kontrolenhederne kan benyttes til at bestemme sedimentets mikrobielle biomasse og det totale organiske kulstofindhold i vand og sediment ved forsøgets slutning. To af kontrolenhederne (dvs. én kontrolenhed af hvert akvatisk sediment) kan anvendes til at overvåge de ønskede parametre i sediment og vand i akklimatiseringsperioden (se tabellen i 1.8.2.2). Når prøvestoffet tilføres ved hjælp af et opløsningsmiddel, skal der indgå to ekstra kontrolenheder til bestemmelse af ugunstig påvirkning af den mikrobielle aktivitet i prøvesystemet,

[1] Prøvning med endnu en koncentration kan være nyttig for stoffer, som tilføres overfladevandene ad forskellige veje med deraf følgende forskelle i koncentration, når blot den laveste koncentration kan analyseres med tilstrækkelig nøjagtighed.

▼B

1.9.3. **Forsøgsvarighed og prøvetagning**

Forsøget bør normalt ikke strække sig over mere 100 dage (6) og skal løbe, indtil nedbrydningsvej og vand/sediment fordelingsmønster er klarlagt, eller indtil 90 % af prøvestoffet er spredt ved omdannelse og/eller fordampning. Antal prøvetagningstidspunkter skal være mindst seks (inklusive tidspunktet nul), idet en hensigtsmæssig prøvetagningsplan og forsøgets varighed fastlægges i en frivillig indledende undersøgelse (se 1.9.4), medmindre der fra tidligere undersøgelser foreligger tilstrækkelige data om prøvestoffet. For hydrofobe prøvestoffer kan ekstra prøvetagningspunkter være nødvendige i den indledende del af forsøgsperioden for at bestemme fordelingsforholdet mellem vand- og sedimentfase.

På passende prøvetagningstidspunkter udtages komplette (ens) inkubationsbeholdere til analyse. Sedimentet og det overliggende vand analyseres hver for sig [1]. Overfladevandet fjernes forsigtigt med mindst mulig forstyrrelse af sedimentet. Til ekstraktion og karakterisering af prøvestof og omdannelsesprodukter skal anvendes egnede analysemetoder. Der drages omsorg for at fjerne materiale, som kan være adsorberet til inkubationsbeholderen eller til de forbindelsesslanger, der anvendes til opsamling af flygtige stoffer.

1.9.4. **Frivillig forundersøgelse**

Kan forsøgsvarighed og prøvetagningsfrekvens ikke skønsmæssigt fastlægges ud fra andre relevante undersøgelser af prøvestoffet, vil en frivillig forundersøgelse eventuelt blive fundet hensigtsmæssig og skal i så fald udføres under de forsøgsbetingelser, som påtænkes for den endelige undersøgelse. Hvis en sådan forundersøgelse gennemføres, skal relevante forsøgsomstændigheder og resultater for denne kortfattet rapporteres.

1.9.5. **Målinger og analyse**

For hvert prøvetagningstidspunkt måles og rapporteres koncentrationen af prøvestof og omdannelsesprodukter i vand og sediment (som koncentration og som procent af tilført mængde). Normalt skal omdannelsesprodukter, som på noget prøvetagningstidspunkt er detekteret som ≥10 % af den mængde radioaktivitet, der er tilført det samlede vand-sediment-system, identificeres, medmindre undladelse heraf med rimelighed kan begrundes. Også for omdannelsesprodukter med konstant stigende koncentration hen gennem forsøget må identifikation overvejes selv om deres koncentrationen ikke er over de nævnte grænser, da dette tyder på, at de er persistente. Der må ske en konkret vurdering heraf i det enkelte tilfælde, og begrundelser gives i rapporten.

Resultater fra opsamlingen af gasser/flygtige stoffer (CO_2 og andet, dvs. flygtige organiske forbindelser), rapporteres for hvert prøvetagningstidspunkt. Mineraliseringshastigheder skal ligeledes rapporteres. Ikke-ekstraherbare (bundne) rester i sediment rapporteres for hvert prøvetagningspunkt.

[1] Hvis anaerobe omdannelsesprodukter let kan blive reoxideret, skal der opretholdes anaerobe betingelser under prøvetagning og analyse.

▼B

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

For hvert prøvetagningstidspunkt beregnes en total massebalance eller genfindingsgrad (se 1.7.1) for den tilsatte radioaktivitet. Resultaterne angives i procent af tilsat mængde radioaktivitet. For hvert prøvetagningstidspunkt skal fordelingen af radioaktivitet mellem vand og sediment angives som koncentration og som procentdel.

Halveringstiden, DT_{50} og, i givet fald, DT_{75} og DT_{90} for prøvestoffet beregnes med tilhørende konfidensgrænser (jf. 1.7.3). Oplysninger om prøvestoffets spredning i vand og sediment kan opnås ved hjælp af passende evalueringsværktøjer. Disse kan række fra anvendelse af pseudo første ordens kinetik og empirisk kurvetilpasning med grafisk eller numerisk løsning til mere komplekse analyser, f.eks. baseret på en- eller flerkompartmentmodeller. Nærmere detaljer kan hentes i litteraturen (35)(36)(37).

Alle metoderne har stærke og svage sider og er meget forskellige i kompleksitet, Antagelse af første ordens kinetik kan være en oversimplificering af nedbrydnings- og fordelingsprocesserne, men når den er er mulig, resulterer den i et letforståeligt begreb (hastighedskonstanten eller halveringstiden), som er værdifuldt i simuleringsmodeller og beregninger af forventede koncentrationer i miljøet. Empiriske metoder eller lineær transformation kan give bedre tilpasning af kurver til data og dermed mulighed for bedre skøn over halveringstider, DT_{50}- og, i givet fald. DT_{75}- og DT_{90}-værdier. De afledte konstanter har imidlertid begrænset anvendelse. Af kompartmentmodeller kan uddrages en række nyttige konstanter, som har værdi ved risikovurderinger og beskriver nedbrydningshastigheden i forskellige kompartments og det kemiske stofs fordeling. Desuden bør de anvendes ved bestemmelse af hastighedskonstanter for dannelse og nedbrydning af hovedomdannelsesprodukterne. I alle tilfælde skal valget af den anvendte metode begrundes, og eksperimentatoren skal grafisk og/eller statistisk påvise tilpasningsgraden.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Prøvestof;

— generisk navn, kemisk navn. CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) af prøvestoffet

— i givet fald, det mærkede kemiske stofs radiokemiske renhed og molære aktivitet.

▼B

Referencestoffer:

— kemisk navn og struktur for de referencestoffer, som er anvendt til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter

Testsedimenter og -vande:

— beliggenhed og beskrivelse af det eller de steder, hvor der er udtaget prøver af akvatisk sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening

— udtømmende oplysninger om indsamling, eventuel opbevaring og akklimatisering af vand-sediment systemer

— vand-sediment prøvernes karakteristika som angivet i tabellen i 1.8.2.2.

Forsøgsbetingelser:

— det anvendte forsøgssystem (f.eks. gennemstrømning, biometer, ventilationsmåde, omrøringsmåde, vandvolumen, sedimentmasse, tykkelsen af både sediment- og vandlag, prøvekarrenes dimension osv.)

— tilførsel af prøvestoffet til systemet: anvendt testkoncentration, antal gentagelser og kontrolprøver, måden, hvorpå prøvestoffet tilføres (f.eks. brug af eventuelt opløsningsmiddel) osv.

— inkubationstemperatur

— prøvetagningstidspunkter

— ekstraktionsmetoder og -udbytte samt analysemetoder og detektionsgrænser

— metoder til karakterisering/identifikation af omdannelsesprodukter

— afvigelser fra forsøgsprotokollen eller forsøgsbetingelserne under forsøget.

Resultater:

— rådata (talværdier) for repræsentative analyser (samtlige rådata skal opbevares i GLP-arkivet)

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— genfindingsgrad (%-værdier for en gyldig undersøgelse er angivet i 1.7.1)

— tabeller med resultater, angivet i % af den tilførte begyndelsesdosis og i rng.kg^{-1} i vand, sediment og det samlede system (kun som %) for prøvestoffet og, i givet fald, for omdannelsesprodukter og ikke- ekstraherbar radioaktivitet

— massebalance før, under og efter forsøgene

— grafisk fremstilling af omdannelsen i vand- og sedimentfraktionen og det samlede system (inklusive mineralisering)

— mineraliseringshastigheder

▼B

— halveringstid, DT_{50} og, i givet fald, DT_{75} and DT_{90} for prøvestoffet og for eventuelle hovedomdannelsesprodukter i vand, sediment og det samlede system

— en vurdering af omdannelseskinetikken af prøvestoffet og, i givet fald, hovedomdannelsesprodukterne

— formodet omdannelsesvej. når det er relevant

— diskussion af resultater.

4. **HENVISNINGER**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (19S2). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 3O4A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R, Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114, J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987), The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop »A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests«, 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 3 1, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber. J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn. D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986), A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C- radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants, Bulletin Environ. Contam, Toxicol, 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II, Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

Bilag 1

VEJLEDNING I AEROBE OG ANAEROBE TESTSYSTEMER

Aerobt testsystem

Det her beskrevne aerobe testsystem består af et aerobt vandlag (typisk iltkoncentration fra 7 til 10 $mg.l^{-1}$) og et sedimentlag, som er aerobt ved overfladen og anaerobt under overfladen (typisk gennemsnitligt redoxpotentiale (E_h) i sedimentlagets anaerobe zone: - 80 til - 190 mV). Der ledes befugtet luft hen over vandoverfladen i hver inkubationsenhed for at opretholde tilstrækkelig iltkoncentration i head space.

Anaerobt testsystem

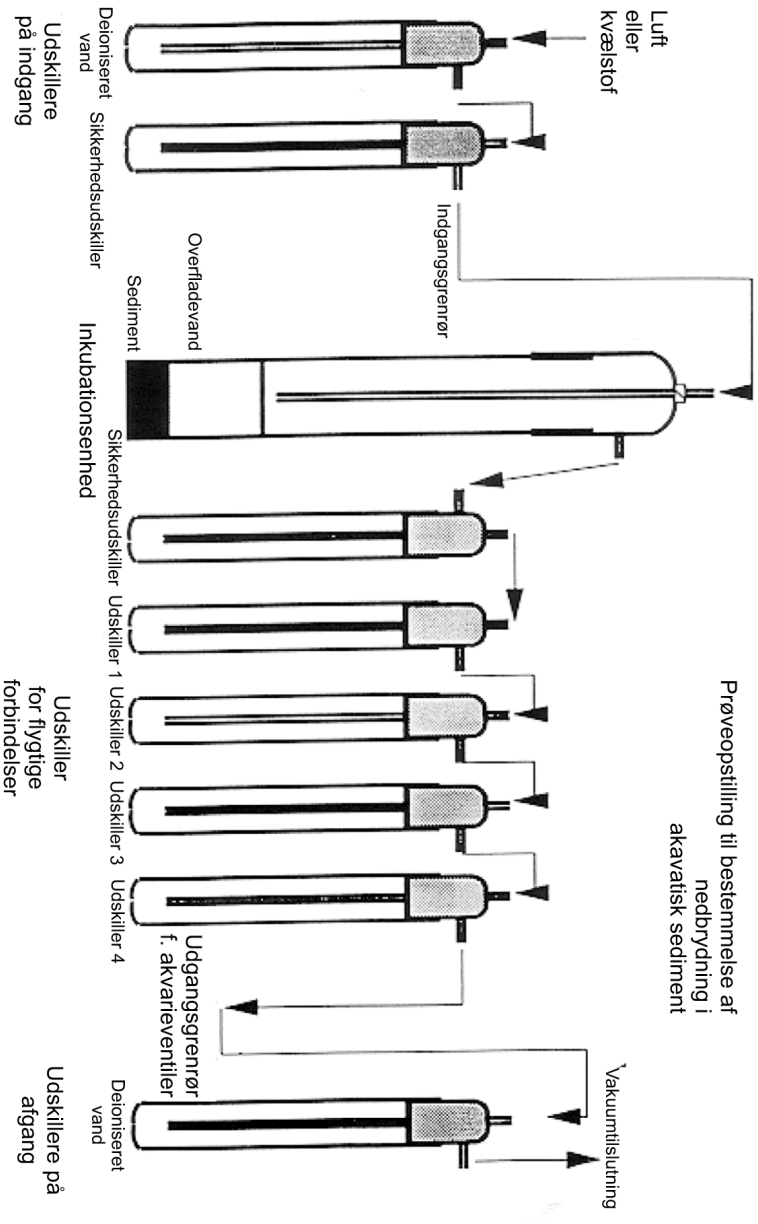
Forsøgsmetoden med det anaerobe testsystem er i hovedsagen den samme som for det aerobe system, bortset fra at der ledes befugtet kvælstof over vandoverfladen for at opretholde et nitrogenfyldt headspace. Sediment og vand anses for anaerobt, når redoxpotentialet (E_h) er under - 100 mV.

I det anaerobe forsøg omfatter bestemmelsen af mineraliseringen måling af den udviklede kuldioxid og methan.

▼B

Bilag 2

EKSEMPEL PÅ GENNEMSTRØMNINGSAPPARAT

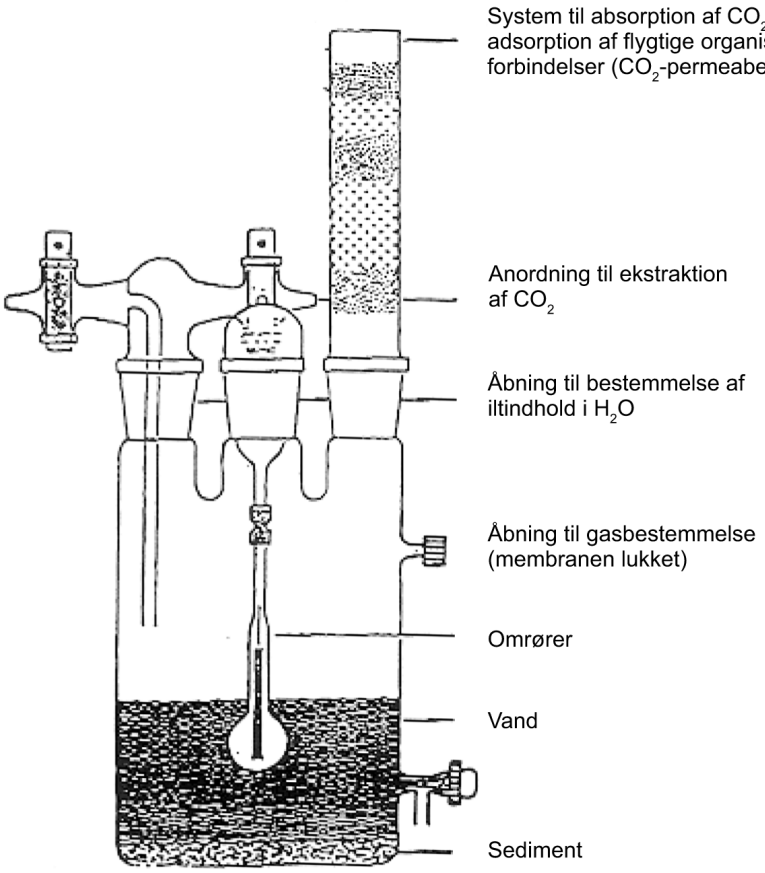


Sikkerhedsudskiller, tom
Udskiller 1:
ethylenglycol til udskillelse af flygtige organiske forbindelser
Udskiller 2:
svovlsyre, 0,1 M, til udskillelse af flygtige alkaliske forbindelser
Udskiller 3 og 4:
natriumhydroxid, 2 M, til udskillelse af CO_2 og andre flygtige sure forbindelser

▼B

Bilag 3

EKSEMPEL PÅ APPARAT AF BIOMETERTYPEN



▼B

Bilag 4

EKSEMPEL PÅ BEREGNING AF MÆNGDE TILSAT PRØVEBEHOLDERNE

Flankens indvendige diameter:	= 8 cm
Dybde af vandsøjle, eksklusive sediment:	= 12 cm
Overfladeareal: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Spredemængde: 500 g prøvestof/ha svarer til 5 µg/cm^2	
Total µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Mængden korrigeres til en dybde på 100 cm: $12 \times 251{,}5 : 100$	= 30,18 µg
Vandsøjlens rumfang: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrationen i vand: $30{,}18 : 603$	= 0,050 µg/ml eller 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROB MINERALISERING I OVERFLADEVAND — SIMULERET BIONEDBRYDNINGSFORSØG

1. METODE

Metoden er ækvivalent med OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. INDLEDNING

Formålet med forsøget er at bestemme det tidsmæssige forløb af bionedbrydningen af et prøvestof med lav koncentration i aerobt naturligt vand og at kvantificere iagttagelserne i form af kinetiske hastighedsudtryk. Dette simuleringsforsøg er et shake-flask batch-forsøg i laboratoriet og har til formål at bestemme hastigheden af aerob bionedbrydning af organiske stoffer i prøver af naturligt vand (ferskvand, brakvand eller søvand). Det bygger på ISO/DIS 14592-1 (2) og indeholder desuden elementer fra prøvemetode C.23 og C.24 (3)(4). Langvarige forsøg kan valgfrit udføres som semikontinuerte forsøg i stedet for batchforsøg for at undgå ældning af mikromiljøet i forsøget. Hovedformålet med simuleringsforsøget er at bestemme mineraliseringen af prøvestoffet i overfladevand, og mineraliseringen danner grundlaget for de udtryk, der formulerer nedbrydningskinetikken. Et sekundært, valgfrit formål med forsøget er imidlertid at skaffe oplysninger om den primære nedbrydning og dannelsen af de vigtigste omdannelsesprodukter. Identifikation af omdannelsesprodukter og, om muligt, kvantitativ bestemmelse af disse er særligt vigtig for stoffer, der mineraliseres meget langsomt (f.eks. med en halveringstid for total residual ^{-14}C på over 60 dage). Pga. begrænsningerne i analyseteknikken bør der normalt anvendes højere prøvestofkoncentration (f.eks. > 100 µg/l) til identifikation og kvantificering af vigtige omdannelsesprodukter.

I dette forsøg forstås ved »lav koncentration« en koncentration, der er så lav (f.eks. mindre end 1 µg/l til 100 µg/l), at den i forsøget iagttagne bionedbrydningskinetik med sikkerhed afspejler den, der forventes at gælde i miljøet. I forhold til den samlede masse bionedbrydeligt kulstofsubstrat, der er til rådighed i det i forsøget anvendte naturlige vand, vil prøvestoffet, der er til stede i lav koncentration, kun være et sekundært substrat. Dette forudsætter, at den forventede bionedbrydningskinetik er af første orden (»non-growth« kinetik), og at prøvestoffet kan nedbrydes ved »co-metabolisme«. Ved første ordens kinetik er nedbrydningshastigheden (mg/l/dag) proportional med substratkoncentrationen, der aftager med tiden. Ved ægte første ordens kinetik er den specifikke nedbrydningshastighedskonstant, k, uafhængig af tiden og af koncentrationen. Det vil sige, at k ikke ændrer sig nævneværdigt i samme forsøg og ikke ændrer sig med den tilsatte koncentration mellem forskellige forsøg. Ved den specifikke nedbrydningshastighedskonstant forstås den relative koncentrationsændring pr. tidsenhed: k. Ved første ordens kinetik er nedbrydningshastigheden (mg/l/dag) proportional med substratkoncentrationen, der aftager med tiden. Ved ægte første ordens kinetik er den specifikke nedbrydningshastighedskonstant, k, uafhængig af tiden og af koncentrationen. Det vil sige, at k ikke ændrer sig nævneværdigt i samme forsøg og ikke ændrer sig med den tilsatte koncentration mellem forskellige forsøg. Ved den specifikke nedbrydningshastighedskonstant forstås den relative koncentrationsændring pr. tidsenhed: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Skønt der under de foreskrevne betingelser normalt forventes første ordens kinetik, kan der være omstændigheder, hvor andre kinetiske love giver bedre overensstemmelse. Afvigelser fra første ordens kinetik ses f.eks., hvis det er massetransportfænomener, f.eks. diffusionshastigheden, snarere end den biologiske reaktionshastighed, der er hastighedsbegrænsende for den biologiske omdannelse. Data kan imidlertid næsten altid beskrives ved pseudo første ordens kinetik, når det accepteres, at hastighedskonstanten er koncentrationsafhængig.

▼M1

Inden forsøget bør der foreligge oplysninger om biologisk nedbrydning af prøvestoffet ved højere koncentrationer (f.eks. fra rutinemæssige screeningstest) og oplysninger om abiotisk nedbrydning, omdannelsesprodukter og relevante fysisk-kemiske egenskaber, hvilket vil lette planlægning af forsøget og fortolkning af resultaterne. Ved at anvende ^{14}C-mærket prøvestof og bestemme fasefordelingen af ^{14}C ved forsøgets afslutning kan den endelige bionedbrydelighed bestemmes. Er prøvestoffet umærket, kan den endelige bionedbrydning kun bestemmes, hvis der testes en højere koncentration, og alle vigtige omdannelsesprodukter kendes.

1.2. DEFINITIONER

Primær bionedbrydning: Den strukturændring (omdannelse) af et kemisk stof, der frembringes af mikroorganismer og medfører, at stoffet mister sin kemiske identitet.

Funktionel bionedbrydning: Den strukturændring (omdannelse) af et kemisk stof, som frembringes af mikroorganismer og medfører tab af en bestemt egenskab.

Endelig aerob bionedbrydning: Den af mikroorganismer i tilstedeværelse af oxygen frembragte nedbrydning af et kemisk stof til carbondioxid, vand og uorganiske salte af eventuelle andre grundstoffer, der er til stede (mineralisering) og produktion af ny biomasse og organiske mikrobielle biosynteseprodukter.

Mineralisering: Den af mikroorganismer i tilstedeværelse af oxygen frembragte nedbrydning af et kemisk stof eller organisk materiale til carbondioxid, vand og uorganiske salte af eventuelle andre grundstoffer, der er til stede.

Lag-fase: Den tid, der går fra et forsøg begynder, indtil de nedbrydende mikroorganismer har tilpasset sig, og nedbrydningsgraden for et kemisk stof eller organisk materiale har nået et detekterbart omfang (f.eks. 10 % af den teoretiske maksimale bionedbrydning, evt. mindre, afhængigt af måleteknikkens nøjagtighed).

Maksimal bionedbrydningsgrad: Den grad af bionedbrydning af et kemisk stof eller organisk materiale, angivet i procent, der finder sted i et forsøg, og over hvilken der ikke sker yderligere bionedbrydning under forsøget.

Primært substrat: En række naturlige kulstof- og energikilder, der tjener til vækst og opretholdelse af den mikrobielle biomasse.

Sekundært substrat: En substratkomponent, der er til stede i så lav koncentration, at dens nedbrydning kun tilfører ubetydelige mængder kulstof og energi til de kompetente mikroorganismer i forhold til den mængde kulstof og energi, der tilføres ved nedbrydning af hovedsubstratets komponenter (de primære substrater).

Nedbrydningshastighedskonstant: En første ordens eller pseudo første ordens hastighedskonstant k (d^{-1}), der angiver nedbrydningsprocessers hastighed. For et batch-forsøg beregnes k af den første del af nedbrydningskurven efter slutningen af lag-fasen.

▼M1

Halveringstid, $t_{1/2}$ (d): En betegnelse til karakterisering af hastigheden af en første ordens reaktion. Halveringstiden er tidsrummet svarende til en formindskelse af koncentrationen med en faktor 2. Sammenhængen mellem halveringstiden og hastighedskonstanten er givet ved udtrykket $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Nedbrydningshalveringstid, DT_{50} (d): En betegnelse, der anvendes til kvantitativ angivelse af resultatet af bionedbrydningsforsøg. Det er det tidsrum, inklusive lag-fasen, der er nødvendigt for at nå 50 % bionedbrydning.

Detektionsgrænse (limit of detection (LOD)) og kvantificeringsgrænse (limit of quantification (LOQ)): Detektionsgrænsen er den koncentration af et stof, under hvilken stoffets identitet ikke kan skelnes fra analysebetingede artefakter. Kvantificeringsgrænsen er den koncentration af et stof, under hvilken koncentrationen ikke kan bestemmes med acceptabel nøjagtighed.

Opløst organisk kulstof (dissolved organic carbon (DOC)): Den del af det organiske kulstofindhold i en prøve af vand, som ikke kan fjernes ved den foreskrevne faseadskillelse som f.eks. ved centrifugering ved 40 000 ms^{-2} i 15 min. eller ved membranfiltrering med porestørrelse 0,2 μm-0,45 μm i diameter.

Total organisk ^{14}C-aktivitet (total organic ^{14}C activity (TOA)): Den totale ^{14}C-aktivitet, der er knyttet til organisk kulstof.

Opløst organisk ^{14}C-aktivitet (dissolved organic ^{14}C activity (DOA)): Den totale ^{14}C-aktivitet, der er knyttet til opløst organisk kulstof.

Partikelbåren organisk ^{14}C-aktivitet (particulate organic ^{14}C activity (POA)): Den totale ^{14}C-aktivitet, der er knyttet til partikelformigt organisk kulstof.

1.3. PRØVEMETODENS ANVENDELIGHED

Denne simuleringsmetode er anvendelig til ikke-flygtige eller svagt flygtige organiske stoffer, der testes ved lave koncentrationer. Når der bruges kolber med åben forbindelse til atmosfæren (f.eks. med vatprop), kan stoffer med Henrys lov konstant mindre end omkring 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ca. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) i praksis regnes for ikke-flygtige. Ved at anvende lukkede kolber med headspace kan man teste svagt flygtige stoffer (med Henrys lov konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) uden tab fra prøvesystemet. Tab af ^{14}C-mærkede stoffer kan forekomme, hvis der ikke er truffet passende forholdsregler, når CO_2 fjernes. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at opfange CO_2 i en intern absorber med alkali eller i et eksternt CO_2-absorbersystem (direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse, jf. tillæg 3). Til fastlæggelse af bionedbrydningens kinetik skal prøvestofkoncentrationen være lavere end stoffets opløselighed i vand. Det skal dog bemærkes, at man i litteraturen kan finde væsentligt højere værdier for vandopløseligheden end prøvestoffets opløselighed i naturlige vande. Om ønsket kan opløseligheden af prøvestoffer med ringe vandopløselighed bestemmes ved brug af de naturlige vande, som forsøget omfatter.

Metoden kan dels anvendes til simulering af bionedbrydning i overfladevand fri for grove partikler (»pelagisk forsøg«), dels i uklart vand som f.eks. nær grænsefladen mellem vand og sediment (»forsøg med opslæmmet sediment«).

▼M1

1.4. FORSØGETS PRINCIP

Forsøget udføres som batchforsøg med inkubering af prøvestoffet enten med overfladevand alene (»pelagisk forsøg«) eller overfladevand modificeret med en opslæmmet mængde faststof/sediment på 0,01 til 1 g tør vægt pr. liter (»forsøg med opslæmmet sediment«) til simulering af en vandmasse med opslæmmede faststoffer eller genopslæmmet sediment. I de fleste overfladevande vil koncentrationen af opslæmmet faststof/sediment typisk ligge i den nedre ende af dette interval. Prøvekolberne inkuberes i mørke ved rumtemperatur under aerobe forhold og med omrystning. Prøvestoffet skal anvendes i mindst to forskellige koncentrationer til fastlæggelse af nedbrydningskinetikken. De anvendte koncentrationer skal indbyrdes afvige med en faktor 5 til 10 og skal være repræsentative for det forventede koncentrationsområde i miljøet. Den maksimale prøvestofkoncentration må ikke være over 100 μg/l, dog må en maksimal prøvekoncentration på 10 μg/l eller derunder foretrækkes for at sikre, at bionedbrydningen følger første ordens kinetik. Den laveste koncentration må ikke være over 10 μg/l, men en laveste prøvekoncentration på 1-2 μg/l eller under 1 μg/l må foretrækkes. En så lav koncentration kan normalt analyseres tilfredsstillende ved hjælp af gængse ^{14}C-mærkede stoffer. Analyseteknikkens begrænsninger gør det ofte umuligt at måle prøvestoffets koncentration med den krævede nøjagtighed, hvis prøvestoffet tilsættes i en koncentration ≤ 100 μg/l (jf. andet afsnit i punkt 1.7.2). Til identifikation og kvantitativ bestemmelse af de vigtigste omdannelsesprodukter kan anvendes højere prøvestofkoncentration (> 100 μg/l, undertiden > 1 mg/l), hvis man ikke råder over en specifik analysemetode med lav detektionsgrænse. Anvendes en høj prøvestofkoncentration, kan resultaterne muligvis ikke anvendes til at beregne første ordens nedbrydningskonstant og halveringstid, da nedbrydningen antagelig ikke vil følge første ordens kinetik.

Nedbrydningen følges med passende tidsintervaller ved måling enten af residual–^{14}C eller, hvis en specifik kemisk analyse anvendes, residualkoncentration af prøvestoffet. ^{14}C-mærkning af den mest stabile del af molekylet giver mulighed for bestemmelse af den totale mineralisering, mens ^{14}C-mærkning af en mindre stabil del af molekylet i lighed med en specifik analysemetode kun gør det muligt at bestemme den primære bionedbrydning. Den mest stabile del omfatter dog ikke nødvendigvis molekylets relevante funktionelle enhed (dvs. den enhed, der kan være knyttet til en specifik egenskab som toksicitet, bioakkumulering osv.). I så fald kan det være hensigtsmæssigt at ^{14}C-mærke prøvestoffet i den funktionelle gruppe for at følge eliminationen af den specifikke egenskab.

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Både radioaktivt mærket og umærket prøvestof kan anvendes i forsøget. ^{14}C-mærkning anbefales, og mærkning bør normalt finde sted i molekylets mest stabile del(e) (jf. også punkt 1.4). I stoffer indeholdende mere end én aromatisk ring skal helst et eller flere kulstofatomer i hver ring være ^{14}C-mærket. I bindinger, der let brydes, skal desuden et eller flere kulstofatomer på begge sider af bindingen helst være ^{14}C-mærket. Prøvestoffets kemiske og/eller radiokemiske renhed skal være > 95 %. For radioaktivt mærkede stoffer skal den specifikke aktivitet helst være ca. 50 μCi/mg (1,85 MBq) eller derover for at lette ^{14}C-målingerne i forsøg med lav initialkoncentration. Følgende oplysninger om prøvestoffet skal foreligge:

▼**M1**

— vandopløselighed [metode A.6]

— opløselighed i organiske(e) opløsningsmiddel (-midler) (stoffer, der tilføres med opløsningsmiddel eller er tungtopløselige i vand)

— for stoffer, som kan protoniseres eller deprotoniseres, dissociationskonstant (pKa) [OECD TG 112] (5)

— damptryk [metode A.4] og Henrys konstant

— kemisk stabilitet i vand og i mørke (hydrolyse) [metode C.7].

Når tungtopløselige stoffer testes i søvand, kan det desuden være nyttigt at kende udsaltningskonstanten (eller »Setschenows konstant«) K^s, der er defineret ved udtrykket: log (S/S') = K^s C_m, where S and S' er stoffets opløselighed i henholdsvis ferskvand og søvand, og C_m er den molære saltkoncentration.

Udføres forsøget som »forsøg med opslæmmet sediment«, skal der foreligge følgende oplysninger:

— fordelingskoefficient n-octanol/vand [metode A.8]

— adsorptionskoefficient [metode C.18].

Desuden kan følgende oplysninger være nyttige:

— stoffets koncentration i miljøet, hvis den kendes eller er beregnet

— prøvestoffets toksicitet over for mikroorganismer [metode C.11]

— umiddelbar og/eller naturlig bionedbrydelighed [metode C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)]

— aerob eller anaerob bionedbrydelighed i omdannelsesforsøg i jord og sediment/vand [metode C.23 og C.24].

1.6. REFERENCESTOF

Som referencestof anvendes et stof, der normalt er let nedbrydeligt under aerobe forhold (f.eks. anilin eller natriumbenzoat). Anilin og natriumbenzoat nedbrydes sædvanligvis på mindre end to uger. Formålet med referencestofferne er at sikre, at prøvevandets mikrobielle aktivitet er inden for visse grænser, dvs. at vandet indeholder en aktiv mikrobiel population.

▼M1

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfinding**

Umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet skal hver begyndelseskoncentration verificeres ved måling af ^{14}C-aktiviteten eller, for umærkede stoffer, ved kemisk analyse, idet der mindst anvendes dobbelte prøver. Dette vil give oplysninger om analysemetodens anvendelighed og repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er fordelt. Ved den efterfølgende dataanalyse anvendes normalt den målte initiale ^{14}C-aktivitet eller prøvestofkoncentration i stedet for den nominelle koncentration, så der tages højde for sorptionstab og doseringsfejl. For ^{14}C-mærket prøvestof fås genfindingsgraden ved forsøgets slutning af en massebalance (jf. sidste afsnit i punkt 1.8.9.4). Ideelt skal massebalancen for radioaktivt mærket stof ligge mellem 90 % og 110 %, mens der for umærkede prøvestoffer bør opnås en analysenøjagtighed svarende til en genfinding af initialmængden på mellem 70 % og 110 %. De nævnte områder må opfattes som mål, ikke som acceptkriterier for forsøget. Hvis det ønskes, kan analysenøjagtigheden for prøvestoffet bestemmes ved en lavere koncentration end initialkoncentrationen samt for de vigtigste omdannelsesprodukter.

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (herunder udvindingsgraden for den indledende ekstraktion) ved kvantitativ bestemmelse af prøvestof og, hvis relevant, omdannelsesprodukter kontrolleres ved fem replikate analyser på hver enkelt ekstrakt af overfladevand.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukterne skal så vidt muligt udgøre mindst 1 % af den initiale mængde, der tilføres prøvesystemet. Kvantificeringsgrænsen skal være højst 10 % af den tilsatte koncentration. Til kemisk analyse af mange organiske stoffer og omdannelsesprodukter heraf må prøvestoffet ofte tilsættes i forholdsvis høj koncentration, dvs. > 100 μg/l.

1.8. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.8.1. **Udstyr**

Forsøget kan udføres i koniske eller cylindriske kolber af passende kapacitet (f.eks. 0,5 eller 1,0 liter), lukket med silicone- eller gummiprop, eller i serumflasker med CO_2-tæt låg (f.eks. med butylgummi-septum). En anden mulighed er at udføre forsøget med flere kolber og høste hele kolbens indhold, mindst som dobbeltprøver, ved hvert prøvetagningstidspunkt (jf. sidste afsnit i punkt 1.8.9.1). For ikke-flygtige prøvestoffer, der ikke er radioaktivt mærkede, kræves ikke gastætte propper eller låg. Velegnede er løse vatpropper, der forhindrer kontaminering fra luften (jf. andet afsnit i punkt 1.8.9.1). Svagt flygtige kemiske stoffer bør testes i et system af biometertypen med let omrøring af vandoverfladen. For at sikre mod bakteriel kontaminering kan beholderne valgfrit steriliseres ved opvarmning eller autoklavering inden brug. Desuden anvendes følgende standardlaboratorieudstyr:

— rystebord eller magnetomrørere til konstant omrøring af prøvekolberne

▼M1

— centrifuge

— pH-meter

— turbidimeter til nephelometrisk turbiditetsmåling

— ovn eller mikroovn til bestemmelse af tør vægt

— apparatur til membranfiltrering

— autoklave eller ovn til varmesterilisering af glasapparatur

— udstyr til håndtering af ^{14}C-mærkede stoffer

— udstyr til kvantitativ bestemmelse af ^{14}C-aktivitet i prøver fra CO_2-opsamlingsvæsker og, om nødvendigt, fra sedimentprøver

— analyseudstyr til bestemmelse af prøvestof (og referencestof), hvis der anvendes specifik kemisk analyse (f.eks. gaskromatograf eller højtryksvæskekromatograf).

1.8.2. **Stamopløsninger af prøvestoffet**

Til fremstilling af stamopløsningerne af prøve- og referencestof skal anvendes deioniseret vand (jf. første afsnit i punkt 1.8.7). Det deioniserede vand skal være frit for stoffer, der kan være toksiske for mikroorganismer, og indholdet af opløst organisk kulstof (dissolved organic carbon (DOC)) må ikke være over 1 mg/l (6).

1.8.3. **Indsamling og transport af overfladevand**

Prøvetagningsstedet, hvor overfladevandet indsamles, skal vælges i henhold til formålet med forsøget i den givne situation. Ved valg af prøvetagningssted må der tages hensyn til oplysninger om eventuel tidligere udledning fra landbrug, industri eller husholdninger. Hvis det akvatiske miljø vides at have været forurenet med prøvestoffet eller andre stoffer med analog struktur inden for de foregående fire år, bør det ikke anvendes til indsamling af vandprøver, medmindre undersøgeren udtrykkelig har ønsket at undersøge nedbrydningshastigheden på tidligere eksponerede steder. Vandets pH og temperatur skal måles på indsamlingsstedet. Desuden skal indsamlingsdybden og vandets udseende (f.eks. farve og turbiditet) noteres (jf. punkt 3). Oxygenkoncentrationen og/eller redoxpotentialet i vand og i sedimentets overfladelag skal måles for at påvise, at der er aerobe betingelser, medmindre dette er åbenbart, bedømt ud fra prøvens udseende og tidligere erfaringer med det pågældende sted. Overfladevandet skal transporteres i en omhyggeligt rengjort beholder. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end forsøgstemperaturen. Ved længere transporttid end 2-3 timer anbefales afkøling til 4 °C. Vandprøven må ikke fryses.

▼M1

1.8.4. **Opbevaring og klargøring af overfladevand**

Forsøget bør fortrinsvis igangsættes inden for ét døgn efter prøveindsamlingen. Er opbevaring af vandet nødvendig, bør dette begrænses til kortest mulig tid og må i intet tilfælde overstige fire uger. Vandprøven skal opbevares ved 4 °C med beluftning, indtil den skal bruges. Før brug skal grove partikler fjernes, f.eks. ved filtrering med nylonfilter med maskevidde ca. 100 μm, med et groft papirfilter eller ved bundfældning.

1.8.5. **Klargøring af vand modificeret med sediment (valgfrit)**

Anvendes opslæmmet sediment, tilsættes sedimentet til kolberne indeholdende naturligt vand (som er filtreret for at fjerne grove partikler som beskrevet i punkt 1.8.4), så der dannes en opslæmning med en faststofkoncentration mellem 0,01 og 1 g/l. Overfladesedimentet skal være fra samme indsamlingssted som vandprøven. Afhængigt af det pågældende akvatiske miljø kan overfladesedimentet enten karakteriseres som sediment med højt organisk kulstofindhold (2,5-7,5 %) og fin tekstur eller med lavt organisk kulstofindhold (0,5-2,5 %) og grov tekstur (3). Overfladesedimentet kan klargøres således: Ved hjælp af et transparent plastrør udtages adskillige sedimentkerner, de øverste aerobe lag skæres af (fra overfladen til en dybde af maks. 5 mm) straks efter prøvetagningen, hvorefter de hældes sammen. Den resulterende sedimentprøve transporteres i en beholder med stort luft-headspace for at opretholde aerobe betingelser (prøven afkøles til 4 °C, hvis transporttiden er over 2-3 timer). Sedimentprøven opslæmmes i prøvevandet i forholdet 1:10 og opbevares ved 4 °C med beluftning, indtil den skal bruges. Opbevaringstiden for sedimentet bør begrænses mest muligt og må i intet tilfælde overstige fire uger.

1.8.6. **Semikontinuert metode (valgfri)**

Det kan være nødvendigt med langvarig inkubering (flere måneder), hvis der optræder en lang lag-fase, før nævneværdig nedbrydning af prøvestoffet kan måles. Vides dette i forvejen fra tidligere forsøg med stoffet, kan forsøget indledes med den semikontinuerte metode, hvor en del af prøvevandet eller -opslæmningen udskiftes med mellemrum (jf. tillæg 2). I stedet kan det normale batchforsøg ændres til et semikontinuert forsøg, hvis der ikke er sket nogen nedbrydning af prøvestoffet efter ca. 60 dages testning med batchmetoden (jf. andet afsnit i punkt 1.8.8.3).

1.8.7. **Tilsætning af prøvestoffet (eller referencestoffet)**

For stoffer med stor vandopløselighed (> 1 mg/l) og lav flygtighed (Henrys konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) kan der fremstilles en stamopløsning i deioniseret vand (jf. punkt 1.8.2); en passende mængde stamopløsning tilsættes prøvebeholderne, så den ønskede koncentration opnås. Volumenet af den tilsatte stamopløsning bør holdes så lavt, som det er praktisk muligt (< 10 % af volumenet af den endelige opløsning, om muligt). En anden mulighed er at bruge et større volumen prøvevand til at opløse prøvestoffet, hvilket kan betragtes som et alternativ til brug af organiske opløsningsmidler.

▼M1

Hvis det ikke kan undgås, må stamopløsninger af ikke-flygtige stoffer med ringe vandopløselighed fremstilles ved hjælp af et flygtigt organisk opløsningsmiddel, men opløsningsmidlet må ikke tilsættes systemet i en mængde på over 1 % v/v og må ikke have negativ indvirkning på den mikrobielle aktivitet. Opløsningsmidlet må ikke påvirke prøvestoffets stabilitet i vand. Opløsningsmidlet skal fjernes, så der kun er en yderst ringe mængde tilbage, som ikke nævneværdigt øger DOC-indholdet i prøvevandet eller -suspensionen. Dette skal efterprøves ved stofspecifik analyse eller om muligt ved analyse for DOC (6). Det skal tilstræbes at begrænse den overførte mængde opløsningsmiddel til det absolut nødvendige og sikre, at den tilsatte mængde prøvestof er opløselig i det endelige volumen prøvevand. Tilsætning af prøvestoffet til prøvebeholderne kan ske ved hjælp af andre teknikker som beskrevet i (7) og (8). Når der bruges et organisk opløsningsmiddel til tilsætning af prøvestoffet, skal der køres opløsningsmiddelkontrolprøver, som indeholder prøvevandet (uden tilsætning) samt prøvevand tilsat referencestof, og som behandles på samme måde som aktive prøvebeholdere modificeret med prøvestof i stabiliserende opløsningsmiddel. Formålet med opløsningsmiddelkontrolprøverne er at undersøge eventuel negativ indvirkning af opløsningsmidlet på den mikrobielle population, således som dette kan konstateres ved nedbrydningen af referencestoffet.

1.8.8. **Forsøgsbetingelser**

1.8.8.1. *Forsøgstemperatur*

Inkubering skal enten ske i mørke (hvilket bør foretrækkes) eller i diffust lys ved kontrolleret temperatur (± 2 °C), som kan være felttemperaturen eller en standardtemperatur på 20-25 °C. Felttemperaturen kan enten være prøvens faktiske temperatur på prøvetagningstidspunktet eller en gennemsnitlig felttemperatur på prøvetagningsstedet.

1.8.8.2. *Omrøring*

Der skal sørges for konstant omrystning eller omrøring, så partikler og mikroorganismer holdes opslæmmet. Omrøringen fremmer desuden overførslen af oxygen fra prøvebeholderens headspace til væsken, så aerobe betingelser kan opretholdes. Kolberne anbringes i rystebord (ca. 100 omdrejninger/min.) eller forsynes med magnetomrører. Omrystning eller omrøring skal være kontinuerlig. Omrystning eller omrøring skal dog være så svag som muligt og samtidig opretholde en homogen opslæmning.

1.8.8.3. *Forsøgets varighed*

Forsøget bør normalt ikke strække sig over mere end 60 døgn, medmindre den semikontinuerte metode med periodisk udskiftning af prøvesuspensionen anvendes (jf. punkt 1.8.6 og tillæg 2). Er nedbrydningen af prøvestoffet begyndt i løbet af de første 60 dage, kan batchforsøget dog forlænges til maksimalt 90 dage. Nedbrydningen overvåges med passende tidsintervaller ved bestemmelse af ^{14}C-residualaktivitet eller den udviklede $^{14}CO_2$ (jf. punkt 1.8.9.4) og/eller ved kemisk analyse (punkt 1.8.9.5). Inkubationstiden skal være tilstrækkeligt lang til, at nedbrydningsprocessen kan bedømmes. Nedbrydningsgraden skal helst være over 50 %. For langsomt nedbrydelige stoffer skal nedbrydningsgraden være tilstrækkelig (normalt mere end 20 % nedbrydning) til, at nedbrydningshastighedskonstanten kan bestemmes.

▼M1

Testsystemets pH og oxygenkoncentration skal måles periodisk, medmindre erfaringer fra tilsvarende tidligere forsøg med vand- og sedimentprøver indsamlet på samme sted gør sådanne målinger unødvendige. Under visse betingelser kan metaboliseringen af det primære substrat ved langt større koncentration i vand eller sediment muligvis medføre CO_2-udvikling og oxygenforbrug i et omfang, der ændrer forsøgsbetingelserne væsentligt.

1.8.9. **Fremgangsmåde**

1.8.9.1. *Klargøring af kolber til pelagisk forsøg*

Overfør en passende mængde af prøvevandet til prøvekolberne, højst en tredjedel af kolbens volumen og mindst ca. 100 ml. Også hvis der anvendes flere kolber (for at kunne høste en hel kolbe ved hvert prøvetagningstidspunkt), vil den mest hensigtsmæssige mængde prøvevand være ca. 100 ml, da små prøvevolumener kan påvirke lag-fasens varighed. Prøvestoffet tilsættes fra en stamopløsning som beskrevet i punkt 1.8.2 og 1.8.7. Der skal anvendes mindst to forskellige prøvestofkoncentrationer, der afviger indbyrdes med en faktor 5 til 10, for at nedbrydningskinetikken kan fastlægges og nedbrydningshastighedskonstanten beregnes. Begge de valgte koncentrationer skal være under 100 µg/l og helst i området < 1-10 µg/l.

Kolberne lukkes med propper eller låg, der er uigennemtrængelige for luft og CO_2. Til ikke-^{14}C-mærkede, ikke-flygtige prøvestoffer kan anvendes løse vatpropper, der beskytter mod kontaminering fra luften (jf. punkt 1.8.1), forudsat at alle vigtige nedbrydningsprodukter vides at være ikke-flygtige, og at der anvendes indirekte CO_2-bestemmelse (se tillæg 3).

Kolberne inkuberes ved den valgte temperatur (se punkt 1.8.8.1). Prøver til kemisk analyse eller ^{14}C-måling udtages ved forsøgets begyndelse (dvs. før bionedbrydningen begynder, se punkt 1.7.1) og derefter med passende tidsintervaller i løbet af forsøget. Prøverne kan udtages som delprøver (f.eks. 5 ml aliquoter) fra hver replikat, eller ved at høste en hel kolbe på hvert prøvetagningstidspunkt. Mineraliseringen af prøvestoffet kan bestemmes enten indirekte eller direkte (se tillæg 3). Til pålidelig bestemmelse af hastighedskonstanten kræves sædvanligvis mindst fem prøvetagningspunkter i nedbrydningsfasen (dvs. efter at lag-fasen er slut), medmindre det for hurtigt nedbrydelige stoffer kan godtgøres, at tre prøvetagningspunkter er tilstrækkeligt. For ikke hurtigt nedbrydelige stoffer kan der let foretages flere målinger i nedbrydningsfasen, og der skal i så fald anvendes flere datapunkter til bestemmelse af k. En fast tidsplan for prøvetagningen kan ikke angives, da bionedbrydningshastigheden varierer. Ved langsom nedbrydning anbefales dog ugentlig prøveudtagning. Er prøvestoffet hurtigt nedbrydeligt, udtages prøver dagligt de første tre dage, derefter hver anden eller hver tredje dag. Under visse omstændigheder, således ved stoffer, der hydrolyseres meget hurtigt, kan det være nødvendigt at tage prøver en gang i timen. Inden forsøget gennemføres, anbefales det at udføre et indledende forsøg til bestemmelse af passende prøvetagningsintervaller. Hvis der skal være prøver til rådighed til nærmere specifik analyse, tilrådes det at tage ekstra prøver og derefter vælge dem, der skal analyseres, ved forsøgets slutning i henhold til en bagudrettet strategi, dvs. de sidste prøver analyseres først (se vejledningen i andet afsnit i punkt 1.8.9.5 vedrørende prøvernes stabilitet ved opbevaring).

▼**M1**

1.8.9.2. *Antal kolber og prøver*

Kør et tilstrækkeligt antal prøvekolber til, at der er:

— prøvekolber: mindst to kolber for hver prøvestofkoncentration (helst mindst tre), dog flere kolber for hver koncentration hvis der høstes hele prøvekolber (betegnet F_T) ved hvert prøvetagningstidspunkt

— prøvekolber til beregning af massebalance: mindst to kolber (betegnet F_M) for hver prøvekoncentration

— blindkontrol, intet prøvestof: mindst én blindprøvekolbe (betegnet F_B), kun indeholdende prøvevand

— referencekontrol: to kolber (betegnet F_C) med referencestof (f.eks. anilin eller natriumbenzoat i en koncentration af 10 µg/l). Formålet med referencekontrollen er at bekræfte et minimum af mikrobiel aktivitet. Hvis det er hensigtsmæssigt, kan der anvendes et radioaktivt mærket referencestof, også når nedbrydningen af prøvestoffet overvåges ved kemiske analyser

— steril kontrol: en eller to kolber (betegnet F_S) indeholdende steriliseret prøvevand, til undersøgelse af eventuel abiotisk nedbrydning eller anden ikke-biologisk bortfjernelse af prøvestoffet. Den biologiske aktivitet kan enten standses ved autoklavering (121 °C; 20 min.) af prøvevandet, ved tilsætning af et giftstof (f.eks. natriumazid (NaN_3) i en koncentration af 10-20 g/l, kviksølvchlorid ($HgCl_2$) i en koncentration af 100 mg/l eller formalin i en koncentration af 100 mg/l) eller ved gammabestråling. Anvendes $HgCl_2$, skal dette bortskaffes som giftigt affald. For vand med sediment tilsat i store mængder er det ikke let at opnå sterile forhold; i så fald anbefales gentagne autoklaveringer (f.eks. tre gange). Der må tages højde for, at autoklaveringen kan ændre sedimentets sorptionsegenskaber

— opløsningsmiddelkontroller indeholdende prøvevand og prøvevand med referencestof: dobbelt sæt kolber behandlet med samme mængde opløsningsmiddel og efter samme fremgangsmåde som ved tilsætning af prøvestoffet. Formålet hermed er at afsløre eventuelle skadelige virkninger af opløsningsmidlet ved bestemmelse af nedbrydningen af referencestoffet.

Ved forsøgets tilrettelæggelse må forsøgslederen veje betydningen af et øget antal forsøg op mod et øget antal prøvetagningstidspunkter. Det nøjagtige antal kolber, der er nødvendigt, afhænger af den anvendte metode til bestemmelse af nedbrydningen (se tredje afsnit i punkt 1.8.9.1, punkt 1.8.9.4 og tillæg 3).

▼**M1**

Der skal udtages to delprøver (f.eks. på 5 ml aliquoter) fra hver prøvekolbe på hvert prøvetagningstidspunkt. Anvendes mange kolber for at kunne høste hele kolber, skal der høstes mindst to kolber ved hvert prøvetagningstidspunkt (se første afsnit i punkt 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Klargøring af kolber til forsøg med opslæmmet sediment (valgfrit)*

Der tilsættes det nødvendige volumen prøvevand og, i givet fald, sediment, til prøvekarrene (se punkt 1.8.5). Klargøring af kolber til forsøg med opslæmmet sediment foretages som ved det pelagiske forsøg (se punkt 1.8.9.1 og 1.8.9.2). Der bør fortrinsvis anvendes serumflasker eller kolber af tilsvarende form. De lukkede kolber anbringes vandret på rystebord. Åbne kolber til ikke-^{14}C-mærkede, ikke-flygtige stoffer skal selvfølgelig anbringes stående; i så fald anbefales brug af magnetomrører og magneter overtrukket med glas. Om nødvendigt beluftes kolberne for at opretholde aerobe betingelser.

1.8.9.4. *Radiokemiske bestemmelser*

Den udviklede $^{14}CO_2$ bestemmes indirekte og direkte (se tillæg 3). $^{14}CO_2$ bestemmes indirekte ved forskellen mellem den initiale ^{14}C-aktivitet i prøvevand eller -opslæmning og den totale residualaktivitet på prøvetagningstidspunktet, målt efter forudgående forsuring af prøven til pH 2-3 og fjernelse af CO_2. Derved er uorganisk kulstof fjernet, og den målte resterende aktivitet kommer fra organisk materiale. Indirekte $^{14}CO_2$-betemmelse bør ikke benyttes, hvis der dannes vigtige flygtige omdannelsesprodukter ved omdannelse af prøvestoffet (se tillæg 3). Om muligt bør $^{14}CO_2$-udviklingen måles direkte (se tillæg 3) i mindst én prøvekolbe ved hvert prøvetagningstidspunkt. Derved kan både massebalance og bionedbrydning kontrolleres, men dette kan kun lade sig gøre ved forsøg i lukkede kolber.

Måles den udviklede $^{14}CO_2$ direkte under forsøget, skal der ved forsøgets start opsættes ekstra kolber hertil. Direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse anbefales, hvis der dannes vigtige omdannelsesprodukter ved prøvestoffets omdannelse. Ved hvert målepunkt skal de ekstra flasker forsures til pH 2-3, og $^{14}CO_2$ opsamles i en intern eller ekstern absorber (se tillæg 3).

I stedet kan koncentrationen af ^{14}C-mærket prøvestof og vigtige omdannelsesprodukter bestemmes ved radiokromatografi (f.eks. tyndtlagskromatografi, RAD-TLC) eller ved HPLC med radiokemisk detektion.

Det kan frit vælges, om man vil bestemme fasefordelingen af den resterende radioaktivitet (se tillæg 1) og resterende prøvestof og omdannelsesprodukter.

▼**M1**

Ved forsøgets slutning bestemmes massebalancen ved direkte $^{14}CO_2$-måling med separate prøvekolber, fra hvilke der ikke er udtaget nogen prøver under forsøget (se tillæg 3).

1.8.9.5. *Specifik kemisk analyse*

Er en følsom specifik analysemetode til rådighed, kan den primære bionedbrydning bestemmes ved måling af den totale residualkoncentration af prøvestoffet i stedet for ved brug af radioaktiv mærkning. Anvendes et radioaktivt mærket prøvestof (til måling af total mineralisering), kan der ved sideløbende specifikke kemiske analyser fås værdifulde supplerende oplysninger og efterprøvning af metoden. Specifik kemisk analyse kan desuden anvendes til bestemmelse af omdannelsesprodukter, der dannes ved nedbrydning af prøvestoffet; dette anbefales for stoffer, der mineraliseres med en halveringstid på over 60 dage. For hvert prøvetagningstidspunkt måles og rapporteres koncentrationen af prøvestof og omdannelsesprodukter (som koncentration og som procent af tilført mængde). Generelt kræves et omdannelsesprodukt identificeret, hvis det på noget prøvetagningstidspunkt forefindes i en koncentration $\geq$ 10 % af den tilførte koncentration, medmindre andet med rimelighed kan begrundes. Ligeledes må det overvejes at identificere omdannelsesprodukter, hvis koncentration stiger konstant under forsøget, også selv om koncentrationen ikke overstiger den nævnte grænse, da dette kan være et tegn på, at de persisterer. Hvis prøvestoffet kan tænkes at være genstand for hurtig abiotisk omdannelses (f.eks. hydrolyse), må det overvejes at analysere for omdannelsesprodukterne i sterile kontroller. Nødvendigheden af kvantificering og identifikation af omdannelsesprodukter må vurderes konkret i det enkelte tilfælde, og begrundelser gives i rapporten. Ekstraktion med organisk opløsningsmiddel skal anvendes i henhold til anvisningerne i den pågældende analysemetode.

Alle prøver skal opbevares ved 2 til 4 °C i lufttæt emballage, hvis analysen foretages inden for 24 timer (hvilket må foretrækkes). Ved længere opbevaring skal prøverne fryses ved en temperatur under –18 °C eller konserveres kemisk. Forsuring kan ikke anbefales som konserveringsmetode, da forsurede prøver kan være ustabile. Hvis prøverne ikke analyseres inden for 24 timer, men skal opbevares længere, skal der udføres et forsøg, der godtgør stabiliteten af de betragtede stoffer ved opbevaring under –18 °C eller i konserveret tilstand. Omfatter analysemetoden enten ekstraktion med opløsningsmiddel eller fastfase-ekstraktion (SPE), skal ekstraktionen finde sted straks efter prøvetagning eller efter højst 24 timers opbevaring af prøven i nedkølet tilstand.

Afhængigt af analysemetodens følsomhed kan større prøvevolumener end angivet i punkt 1.8.1 være nødvendige. Forsøget kan let udføres med et prøvevolumen på én liter i kolber med et volumen på 2-3 liter, hvorved der kan udtages prøver på ca. 100 ml.

▼M1

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

2.1.1. **Grafisk fremstilling af data**

Alle prøvetagningstidspunkter afrundes til hele timer (medmindre stoffet nedbrydes væsentligt inden for minutter til timer), men ikke til hele døgn. Der optegnes en kurve over prøvestoffets beregnede residualaktivitet (for ^{14}C-mærkede prøvestoffer) eller residualkoncentration (for umærkede stoffer) som funktion af tiden i både lineær og semilogaritmisk afbildning (se figur 1a og 1b). Har nedbrydning fundet sted, sammenholdes resultaterne for kolber F_T med resultaterne for kolber F_S. Hvis der er mindre end 10 % forskel mellem gennemsnitsresultaterne for kolberne med prøvestof (F_T) og de sterile kolber (F_S), kan den iagttagne nedbrydning antages at være overvejende abiotisk. Hvis nedbrydningen i kolberne F_S er mindre, kan disse tal benyttes til at korrigere tallene for kolberne F_T (ved fratrækning) for at beregne omfanget af bionedbrydningen. Når der foretages valgfrie analyser for vigtige nedbrydningsprodukter, skal der forelægges grafiske kurver over deres dannelse og aftagen foruden en kurve over faldet i prøvestofindholdet.

Lag-fasens varighed t_L beregnes af nedbrydningskurven (semilogaritmisk afbildning) ved at ekstrapolere kurvens lineære del til et punkt svarende til en nedbrydning lig nul eller i stedet ved at bestemme tiden svarende til en nedbrydning på ca. 10 % (se figur 1a og 1b). Af den semilogaritmiske afbildning bestemmes første ordens hastighedskonstanten k og middelfejlen på denne ved lineær regression på kurven over ln (^{14}C-residualaktivitet eller prøvestofkoncentration) som funktion af tiden. Navnlig for ^{14}C-målinger må der kun anvendes data hørende til kurvens første lineære del, der følger efter lag-fasens slutning, og der må gives præference til nogle få udvalgte, repræsentative data frem for et større antal mere usikre data. Usikkerheden indbefatter her de naturlige fejl i den anbefalede direkte brug af målt ^{14}C residualaktivitet (se nedenfor). Hvis nedbrydningen følger et bifasisk mønster, kan det undertiden være relevant at beregne to forskellige hastighedskonstanter. Hertil defineres to forskellige faser af nedbrydningskurven. Hastighedskonstanten k og halveringstiden $t_{½} = \ln 2/k$ beregnes for hver enkelt af de replikate kolber, når der er udtaget delprøver fra samme kolbe, eller ved hjælp af gennemsnitsværdier, når der høstes hele kolber på hvert prøvetagningstidspunkt (se sidste afsnit i punkt 1.8.9.2). Ved førstnævnte fremgangsmåde skal hastighedskonstant og halveringstid rapporteres for hver enkelt replikat kolbe og som gennemsnitsværdi med middelfejl. Er der anvendt høje koncentrationer af prøvestoffet, kan nedbrydningskurven afvige betydeligt fra den rette linje (i semilogaritmisk afbildning), og der gælder ikke nødvendigvis første ordens kinetik. Det har derfor ingen mening at fastlægge en halveringstid. For et begrænset dataområde kan man dog anvende pseudo første ordens kinetik og beregne halveringstiden DT_{50} for nedbrydningen (den tid, der medgår til 50 % nedbrydning). Man må dog være opmærksom på, at nedbrydningens tidsforløb uden for det valgte dataområde ikke kan forudsiges ved hjælp af DT_{50}, der blot er en deskriptor for et givet datasæt. Der findes let tilgængelige analyseredskaber, som letter statistiske beregninger og kurvefitting, og brug af sådan software anbefales.

▼M1

Foretages der specifikke kemiske analyser, beregnes hastighedskonstanter og halveringstider for primær nedbrydning som beskrevet ovenfor for total mineralisering. Hvis den primære nedbrydning udgør den hastighedsbegrænsende proces, kan der undertiden anvendes datapunkter fra hele nedbrydningsforløbet. Dette skyldes, at målingerne er direkte, i modsætning til målingerne af ^{14}C-aktivitet.

Anvendes ^{14}C-mærkede stoffer, skal der opstilles en massebalance i procent af den tilsatte startkoncentration, i det mindste ved forsøgets slutning.

2.1.2. **Residualaktivitet**

Ved bionedbrydning af den ^{14}C-mærkede del af et organisk stof omdannes størstedelen af ^{14}C til $^{14}CO_2$, mens en anden del udnyttes til vækst af biomasse og/eller syntese af ekstracellulære metabolitter. »Fuldstændig« biologisk nedbrydning af et stof medfører derfor ikke 100 % omdannelse af kulstofindholdet til $^{14}CO_2$. Den ^{14}C, der indbygges i produkter dannet ved biosyntese, frigives efterfølgende langsomt som $^{14}CO_2$ ved »sekundær mineralisering«. Kurver, der viser residualaktiviteten af organisk ^{14}C (målt efter fjernelse af CO_2) eller den producerede $^{14}CO_2$ som funktion af tiden, har derfor en »hale«, efter at nedbrydningen er løbet til ende. Dette komplicerer den kinetiske fortolkning af data, og til dette formål bør kun den initiale del af kurven (efter lag-fasens afslutning, og inden ca. 50 % nedbrydning er nået) normalt anvendes til beregning af en hastighedskonstant for nedbrydningen. Hvis prøvestoffet nedbrydes, er den totale organiske ^{14}C-residualaktivitet altid større end den ^{14}C-aktivitet, der skyldes tilbageværende intakt prøvestof. Hvis prøvestoffet nedbrydes ved en første ordens reaktion, og en konstant brøkdel α mineraliseres til CO_2, vil den initiale hældning af ^{14}C-depletionskurven (total organisk ^{14}C som funktion af tiden) være α gange hældningen af den tilsvarende kurve over koncentrationen af prøvestoffet (eller, mere præcist, den del af prøvestoffet, der er mærket med ^{14}C). Hvis målingerne af den totale organiske ^{14}C-aktivitet bruges uden korrektion, vil hastighedskonstanten for nedbrydningen derfor være lavt regnet. I litteraturen er beskrevet metoder til bestemmelse af prøvestofkoncentrationen ud fra den målte radiokemiske aktivitet ved brug af nogle forenklede forudsætninger (2)(9)(10)(11). Sådanne metoder kan lettest anvendes på hurtigt nedbrydelige stoffer.

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Hvis k findes at være uafhængig af den tilsatte koncentration (dvs. den beregnede k-værdi er omtrent ens ved forskellige prøvestofkoncentrationer), kan første ordens hastighedskonstanten antages at være repræsentativ for de anvendte prøvebetingelser, dvs. prøvestoffet, vandprøven og forsøgstemperaturen. I hvilket omfang resultaterne kan generaliseres eller ekstrapoleres til andre systemer, kræver det ekspertviden at vurdere. Anvendes en høj prøvestofkoncentration, så nedbrydningen ikke følger første ordens kinetik, kan data ikke benyttes til direkte beregning af en første ordens hastighedskonstant eller en tilsvarende halveringstid. Dog vil data fra forsøg med høj prøvestofkoncentration stadig være nyttige til beregning af den totale mineraliseringsgrad og/eller detektion og kvantificering af omdannelsesprodukter.

▼M1

Hvis man kender tabsprocenten fra andre tabsprocesser end bionedbrydning (f.eks. hydrolyse eller fordampning), kan de trækkes fra de nettotab, der iagttages under forsøget, hvorved man kan få en tilnærmet bestemmelse af bionedbrydningshastigheden. Data for hydrolyse vil kunne fås fra f.eks. den sterile kontrol eller fra sideløbende forsøg med højere prøvestofkoncentration.

Indirekte og direkte bestemmelse af $^{14}CO_2$ (punkt 1.8.9.4 og tillæg 3) kan kun bruges til at bestemme graden af prøvestoffets mineralisering til CO_2. Koncentrationen af ^{14}C-mærket prøvestof og dannelsen af vigtige omdannelsesprodukter (tredje afsnit i punkt 1.8.9.4) kan analyseres ved radiokromatografi (RAD-TLC) eller HPLC. For at halveringstiden kan bestemmes direkte, må der ikke være vigtige omdannelsesprodukter (defineret som $\geq$ 10 % af den tilsatte mængde prøvestof) til stede. Hvis der er vigtige omdannelsesprodukter, som her defineret, til stede, er en detaljeret vurdering af data nødvendig. En sådan vurdering kan bestå i yderligere undersøgelser og/eller identifikation af omdannelsesprodukterne (se første afsnit i punkt 1.8.9.5), medmindre disses skæbne med rimelig sikkerhed kan vurderes ud fra tidligere erfaringer (f.eks. oplysninger om nedbrydningsvej). Da den andel af prøvestoffets kulstofindhold, der omdannes til CO_2, er forskellig (hovedsagelig afhængig af koncentrationen af prøvestoffet og øvrige tilgængelige substrater, prøvebetingelserne og det mikrobielle miljø), giver forsøget ikke umiddelbar mulighed for beregning af den endelige bionedbrydning som i et DOC die-away forsøg, men resultatet svarer til det, der fås af et respirometrisk forsøg. Mineraliseringsgraden vil således højst være lig med minimumsniveauet af fuldstændig bionedbrydning. For at få et mere fyldestgørende billede af den fuldstændige bionedbrydning (mineralisering og inkorporation i biomasse) bør analysen af fasefordelingen af ^{14}C foretages ved forsøgets slutning (se tillæg 1).^{14}C-indholdet i den samlede partikelmængde vil dels bestå af ^{14}C indbygget i bakteriel biomasse, dels ^{14}C sorberet til organiske partikler.

2.3. FORSØGETS VALIDITET

Hvis referencestoffet ikke nedbrydes inden for det forventede tidsrum (for anilin og natriumbenzoat sædvanligvis mindre end to uger), er forsøgets validitet tvivlsom og må nærmere efterprøves, eller forsøget må i stedet gentages med en ny vandprøve. I en ISO ringtest af metoden med deltagelse af syv laboratorier beliggende forskellige steder i Europa lå hastighedskonstanten for nedbrydning af anilin efter tilpasning mellem 0,3 og 1,7 dag^{-1} med et gennemsnit på 0,8 d^{-1} ved 20 °C og en middelfejl på ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dag). Typiske lag-tider var 1 til 7 dage. De undersøgte vande rapporteredes at have en bakteriel biomasse svarende til 10^3-10^4 kolonidannende enheder (CFU) pr. ml. Nedbrydningshastigheden i næringsstofrige mellemeuropæiske vande var større end i oligotrofe nordiske vande, hvilket kan skyldes forskelle i trofisk status eller tidligere eksponering for kemiske stoffer.

Den totale genfinding (ved massebalance) ved forsøgets slutning bør være mellem 90 % og 110 % for radioaktivt mærkede stoffer, mens den initiale genfinding ved forsøgets begyndelse bør være mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer. De angivne områder må imidlertid kun opfattes som mål og bør ikke anvendes som acceptkriterier for testen.

▼M1

3. **FORSØGSRAPPORT**

Undersøgelsens art, dvs. pelagisk eller med opslæmmet sediment, skal klart angives i forsøgsrapporten, som desuden skal indeholde i det mindste følgende oplysninger:

For prøvestof og referencestof(fer):

— generisk navn, kemisk navn, (anbefalet IUPAC og/eller CAS navn), CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af ^{14}C, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se punkt 1.5 og 1.6)

— kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af ^{14}C, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber for stoffer anvendt som standarder til identifikation og kvantificering af omdannelsesprodukter

— renhed (urenheder) af prøve- og referencestof

— for mærkede stoffer, radiokemisk renhed og specifik aktivitet (når det er relevant).

For overfladevand:

Der skal som minimum gives følgende oplysninger om den udtagne vandprøve:

— beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening

— dato og klokkeslæt for indsamling af prøven

— næringsstofindhold (total N, ammonium, nitrit, nitrat, total P, opløst orthophosphat)

— prøvetagningsdybde

— prøvens udseende (f.eks. farve og turbiditet)

— DOC og TOC

— BOD

— temperatur og pH på prøvetagningsstedet og -tidspunktet

— oxygen- eller redoxpotentiale (kun nødvendigt, hvis der ikke tydeligt ses at være aerobe betingelser)

— saltindhold eller ledeevne (for søvand og brakvand)

— opslæmmet faststof (for uklare prøver)

— eventuelle andre relevante oplysninger om prøvetagningsstedet på prøvetagningstidspunktet (f.eks. aktuelle eller historiske oplysninger om strømhastigheden i vandløb eller havstrømme, nærliggende større udledninger og udledningernes art, vejrforholdene i tiden forud for prøvetagningen)

og, valgfrit:

— mikrobiel biomasse (f.eks. direkte tælling med acridinorange-farvning, eller kolonidannende enheder)

▼**M1**

— uorganisk kulstof

— koncentration af chlorophyll-a som specifik bestemmelse af algebiomasse.

Hvis forsøget udføres med opslæmmet sediment, skal der desuden gives følgende oplysninger om sedimentet:

— prøvetagningsdybde for sedimentet

— sedimentets fremtræden (som f.eks. farvet, mudret, siltholdig eller sandholdig)

— tekstur (f.eks. angivet som % groft sand, fint sand, silt og ler)

— tør vægt af opslæmmet faststof i g/l, TOC-koncentration eller vægttab ved forbrænding som mål for indholdet af organisk stof

— pH

— oxygen- eller redoxpotentiale (kun nødvendigt, hvis der ikke tydeligt ses at være aerobe betingelser).

Forsøgsbetingelser:

— forsinkelse mellem indsamling og anvendelse i laboratorieforsøget, opbevaring og forbehandling af prøven, dato for undersøgelserne

— mængde prøvestof tilført, koncentration under forsøget og referencestof

— tilsætningsmetode for prøvestoffet, herunder brug af eventuelt opløsningsmiddel

— anvendt volumen overfladevand og sediment (hvis anvendt), og volumen udtaget til analyse ved hvert prøvetagningstidspunkt

— beskrivelse af det anvendte prøvesystem.

Hvis forsøget ikke udføres i mørke, oplysninger om betingelserne »diffus belysning«:

— oplysninger om den eller de anvendte metoder til sterilisering af kontrolprøver (f.eks. autoklaveringstemperatur og -tid samt antal autoklaveringer)

— inkubationstemperatur

— oplysninger om analyseteknik og metode(r) anvendt til radiokemiske målinger samt til kontrol af massebalance og målinger af fasefordeling (hvis sådanne er udført)

— antal gentagelser.

Resultater:

— genfindingsprocenter (se punkt 1.7.1)

— reproducerbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder, herunder detektionsgrænse (LOD) og kvantificeringsgrænse (LOQ) (se punkt 1.7.2)

▼**M1**

— alle målte data (herunder prøvetagningstidspunkter) og beregnede værdier i tabelform og nedbrydningskurver; for hver prøvekoncentration og for hver replikat kolbe angives den lineære korrelationskoefficient for kurvehældningen i logaritmisk afbildning, den beregnede lag-fase og en første ordens eller pseudo første ordens hastighedskonstant (hvis dette er muligt) samt den tilsvarende nedbrydningshalveringstid (t_{50})

— relevante værdier angives som gennemsnit af de værdier, der er iagttaget i de enkelte replikater, f.eks. lag-fasens varighed, nedbrydningshastighedskonstanten og nedbrydningshalveringstiden (t_{50})

— systemet rubriceres enten som ikke tilpasset eller tilpasset, bedømt ud fra nedbrydningskurvens udseende og ud fra den mulige indvirkning af prøvekoncentrationen

— resultaterne af den endelige massebalancekontrol og resultaterne af eventuelle fasefordelingsmålinger

— den andel af ^{14}C, der er mineraliseret, og, når specifikke analyser anvendes, den endelige primære nedbrydningsgrad

— identifikation, molær koncentration og procentdel tilsat stof og, når det er relevant, vigtige omdannelsesprodukter (se første afsnit i punkt 1.8.9.5)

— formodet omdannelsesvej, når det er relevant

— diskussion af resultater.

4. **LITTERATUR**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Prøvemetode C.23. Aerob og anaerob omdannelse i jord.

4. Prøvemetode C.24. Aerob og anaerob omdannelse i akvatiske sedimentsystemer.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Tillæg 1

Fasefordeling af ^{14}C

Til kontrol af metoden skal rutinemålingerne af total organisk ^{14}C-residualaktivitet (TOA) suppleres med massebalancemålinger, hvor den udviklede $^{14}CO_2$ bestemmes direkte efter opsamling i absorber (se tillæg 3). Positiv $^{14}CO_2$-dannelse er i sig selv et direkte tegn på bionedbrydning i modsætning til abiotisk nedbrydning eller andre tabsmekanismer som fordampning og sorption. Andre nyttige oplysninger til karakterisering af bionedbrydningsegenskaberne kan fås af målinger af fordelingen af TOA på opløst tilstand (opløst organisk ^{14}C-aktivitet, DOA) og fast partikelform (POA) efter separation af partiklerne ved membranfiltrering eller centrifugering. POA består af prøvestof, der er sorberet på den mikrobielle biomasse og på andre partikler samt af kulstof fra prøvestoffet, der er anvendt til syntese af nyt cellemateriale og derved indbygget i den partikelformige biomassefraktion. Dannelsen af opløst organisk ^{14}C kan bestemmes som DOA, når bionedbrydningen er slut (svarende til plateauet af kurven over nedbrydningen som funktion af tiden).

Fasefordelingen af residual-^{14}C i udvalgte prøver bestemmes ved filtrering af prøven på et 0,22 μm eller 0,45 μm membranfilter af et materiale, der ikke adsorberer nævneværdige mængder prøvestof (polycarbonatfiltre kan være egnede). Er sorptionen af prøvestoffet på filteret for stor til at kunne ignoreres (dette skal verificeres inden forsøget), kan højhastighedscentrifugering (2 000 g; 10 min.) anvendes i stedet for filtrering.

Derefter behandles filtratet eller centrifugatet som beskrevet i tillæg 3 for ufiltrerede prøver. Membranfiltratet opløses i en egnet scintillationsvæske og tælles på sædvanlig måde, idet korrektion for quenching normalt kun foretages ved hjælp af kanalforholdet for ekstern standard eller behandling af prøverne med et blegemiddel. Er der anvendt centrifugering, skal den pellet, der er dannet af partikelfraktionen, genopslæmmes i 1-2 ml destilleret vand og overføres til et scintillationsglas. Derefter vaskes to gange med 1 ml destilleret vand, og vaskevandet overføres til scintillationsglasset. Opslæmningen kan om nødvendigt indlejres i en gel til væskescintillationstælling.

▼M1

Tillæg 2

Semikontinuert metode

Vanskelige stoffer kan kræve inkubation i indtil flere måneder for at opnå tilstrækkelig nedbrydning. Forsøget bør normalt ikke vare over 60 dage, medmindre den normale vandprøves egenskaber opretholdes ved udskiftning af prøveopslæmningen. Er nedbrydningen af prøvestoffet begyndt inden for de første 60 dage, kan forsøget dog forlænges til maksimalt 90 dage, uden at forsøgsopslæmningen udskiftes.

Ved langvarig inkubation kan mangfoldigheden af det mikrobielle samfund blive nedsat som følge af forskellige tabsmekanismer og muligvis opbrugning af essentielle næringsstoffer og primære kulstofsubstrater i vandprøven. Derfor anbefales det at anvende en semikontinuert metode for at få tilfredsstillende bestemmelse af nedbrydningshastigheden for langsomt nedbrydelige stoffer. Den semikontinuerte metode bør anvendes fra forsøgets start, hvis tidligere erfaring viser, at der kræves en inkubationsperiode på tre måneder for at opnå 20 % nedbrydning af stoffet. En anden mulighed er, at det normale batchforsøg ændres til et semikontinuert forsøg, hvis der ikke er sket nogen nedbrydning af prøvestoffet, efter at forsøget har kørt i ca. 60 dage med batchmetoden. Den semikontinuerte udførelse af forsøget kan standses og forsøget fortsættes som et batchforsøg, når der er konstateret en væsentlig nedbrydning (f.eks. > 20 %).

I det semikontinuerte forsøg udskiftes ca. en tredjedel af forsøgsopslæmningens volumen hver anden uge med friskindsamlet vand, som er tilsat prøvestof svarende til initialkoncentrationen. Anvendes den valgfrie metode med opslæmmet sediment, skal udskiftningsvandet desuden tilsættes sediment svarende til initialkoncentration (mellem 0,01 og 1 g/l). Udføres forsøget med opslæmmet sediment, er det vigtigt, at systemet holdes fuldstændig opslæmmet, også mens vandet skiftes, og at der er samme opholdstid for faste stoffer og for vand, da man ellers ikke opnår den tilsigtede overensstemmelse med et homogent vandigt system uden fastliggende faser. Af disse grunde bør initialkoncentrationen af opslæmmet sediment helst være i den nedre del af det foreskrevne interval, når den semikontinuerte metode anvendes.

Den angivne tilsætning af prøvestof forudsætter, at den delvise udskiftning af prøveopslæmningen ikke medfører overskridelse af den initiale prøvestofkoncentration, for at man skal undgå den tilpasning, der ofte ses ved høje prøvestofkoncentrationer. Da metoden både indebærer re-inokulering og kompensation for opbrugte næringsstoffer og primære substrater, genetableres den oprindelige mikrobielle mangfoldighed, og forsøget kan i princippet forlænges ubegrænset. Når den semikontinuerte metode anvendes, at det vigtigt at bemærke, at residualkoncentrationen af prøvestoffet skal korrigeres for de mængder prøvestof, der tilsættes og fjernes ved hver udskiftningsgang. For stoffer, der kun udviser ringe sorption, kan man frit vælge, om man vil bruge totalkoncentrationen eller den opløste koncentration af prøvestoffet. Sorptionen er uden betydning (< 5 %) ved de foreskrevne betingelser (0,1-1 g faststof/l) for stoffer med log K_{ow} < 3 (gælder for neutrale, lipofile forbindelser). Dette illustreres af følgende beregningseksempel. 0,1 g faststof /l svarer til ca. 10 mg kulstof pr. liter (ved en vægtbrøk kulstof, f_C = 0,01). Idet det forudsættes, at

Log K_{ow} (for prøvestoffet) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Fordelingskoefficient, $K_d = f_C \times K_{oc}$

Vil den opløste andel af totalkoncentrationen (C-water (C_w)/C-total (C_t) være:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Tillæg 3

Bestemmelse af $^{14}CO_2$

Indirekte $^{14}CO_2$-bestemmelse

Til rutinemæssige målinger er indirekte bestemmelse normalt den mindst tidskrævende og mest nøjagtige metode, når prøvestoffet er ikke-flygtigt og ikke omdannes til flygtige omdannelsesprodukter. De ufiltrerede prøver overføres simpelthen til scintillationsglas, f.eks. i en mængde af 5 ml. En passende initial aktivitet i prøverne er 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), og en mindste initial aktivitet er ca. 1 000 dpm. CO_2-indholdet fjernes efter forsuring til pH 2-3 med 1-2 dråber koncentreret H_3PO_4 eller HCl. CO_2 -fjernelse kan ske ved gennembobling med luft i ½-1 time. I stedet kan glassene omrystes kraftigt i 1-2 timer (f.eks. på en mikropladeryster) eller med svagere omrystning natten over. Effektiviteten af CO_2-fjernelsen skal kontrolleres (ved forlængelse af beluftnings- eller omrystningsperioden). Der tilsættes derefter en scintillationsvæske egnet til tælling af vandige prøver, prøven homogeniseres i en omrører, og radioaktiviteten måles med væskescintillationstælling, idet man fratrækker den baggrundsaktivitet, der er fundet i blindprøverne (F_B). Medmindre prøvevandet er stærkt farvet eller har et højt partikelindhold, vil prøverne normalt udvise ensartet quenching, og det vil være tilstrækkeligt at korrigere for quenching ved hjælp af en ekstern standard. Hvis prøvevandet er stærkt farvet, kan det være nødvendigt at tilsætte en intern standard til at korrigere for quenching. Er partikelkoncentrationen høj, kan det være umuligt at få en homogen opløsning eller gel, eller prøverne vil udvise store forskelle i quenching. I så fald kan man benytte den tællemetode, der er beskrevet nedenfor for prøveslam. Udføres forsøget med opslæmmet sediment, kan $^{14}CO_2$ måles indirekte ved udtagning af en homogen 10 ml prøve af prøvevand/prøveopslæmning og adskillelse af faserne ved centrifugering med passende hastighed (f.eks. 40 000 m/s^2 i 15 min.). Den vandige fase behandles derefter som ovenfor beskrevet. ^{14}C-aktiviteten i partikelfasen (POA) bestemmes ved genopslæmning af sedimentet i et lille volumen destilleret vand, overførsel til scintillationsglas og tilsætning af scintillationsvæske, så der dannes en gel (særlige scintillationsvæsker fås hertil). Alt efter partiklernes beskaffenhed (f.eks. indholdet af organisk stof) kan det være en fordel at behandle prøven natten over med et vævsopløsende middel og derefter homogenisere den i en omrører, før scintillationsvæsken tilsættes. I stedet kan POA bestemmes ved forbrænding i overskud af oxygen ved hjælp af en oxidiser. Ved tællingen skal der altid medtages interne standarder, og det kan være nødvendigt at korrigere hver enkelt prøve for quenching ved tilsætning af intern standard.

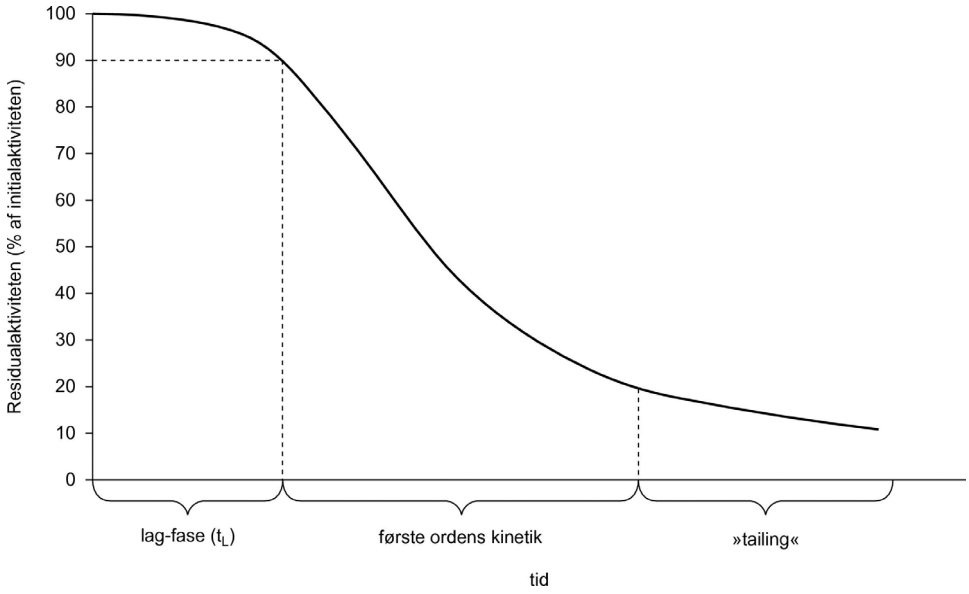
Direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse

Hvis den udviklede $^{14}CO_2$ måles direkte, skal det ske ved at opsætte ekstra kolber ved forsøgets begyndelse og høste prøvekolberne i hvert målepunkt ved forsuring af kolberne til pH 2-3 og indsamling af $^{14}CO_2$ i en intern (anbragt i hver prøvekolbe ved forsøgets begyndelse) eller ekstern absorber. Som absorptionsmiddel kan enten anvendes alkali (f.eks. 1 N NaOH-opløsning eller en NaOH-pellet), ethanolamin eller en ethanolamin-baseret absorber, eller andre gængse absorbere. Til direkte måling af $^{14}CO_2$ skal kolberne lukkes med septa f.eks. af butylgummi.

▼**M1**

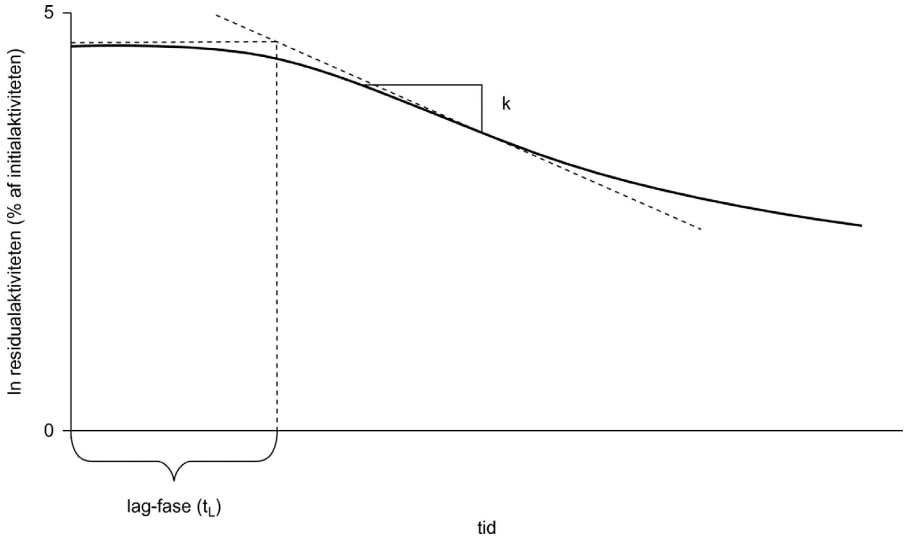
Figur 1a

Eksempel på aritmetisk kurve over data (residualaktiviteten som funktion af tiden)



Figur 1b

Eksempel på semilogaritmisk kurve over data (ln til residualaktiviteten som funktion af tiden)



▼M6

C.26. LEMNA SP. VÆKSTHÆMNINGSTEST

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 221 (2006). Den anvendes til at vurdere kemikaliers toksicitet for akvatiske ferskvandsplanter af slægten Lemna (andemad). Den er baseret på eksisterende metoder (1)(2)(3)(4)(5)(6), men der er foretaget ændringer, som afspejler den senere tids forskning og drøftelser vedrørende en række vigtige punkter. Testmetoden er blevet valideret ved en international ringtest (7).

2. I denne testmetode beskrives toksicitetstestning med Lemna gibba og Lemna minor, der begge har været genstand for omfattende undersøgelser og er omhandlet i ovennævnte standarder. Taksonomien for Lemna spp. er vanskelig, idet den kompliceres af, at der findes en bred vifte af fænotyper. Genetisk variation i Lemnas respons på giftstoffer kan forekomme, men de aktuelt foreliggende oplysninger om denne kilde til variation er utilstrækkelige som grundlag for at anbefale en bestemt klon til brug i nærværende testmetode. Det skal bemærkes, at testen ikke udføres axenisk, men nogle af testprocessens trin er foranstaltninger, der skal holde kontamineringen med andre organismer nede på et minimum.

3. Der gives en nærmere beskrivelse af testning med udskiftning af testopløsningen (semistatisk test og gennemstrømningstest) og uden udskiftning (statisk). Afhængigt af målsætningen for testen og myndighedernes krav anbefales det at overveje brug af den semistatiske metode og gennemstrømningsmetoden f.eks. til kemikalier, der hurtigt forlader opløsningen ved fordampning, fotonedbrydning, udfældning eller bionedbrydning. Nærmere anvisninger er givet i (8).

4. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

5. Eksponentielt voksende plantekulturer af slægten Lemna dyrkes som monokultur ved forskellige koncentrationer af testkemikaliet i syv dage. Testens formål er at kvantificere kemikalierelaterede virkninger på den vegetative vækst i dette tidsrum, baseret på vurdering af udvalgte målevariable. Bladantallet er den primære målevariabel. Der måles desuden mindst en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), da nogle kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end bladantallet. De kemikalierelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrollerne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og som betegnes EC_x (f.eks. EC_{50}).

6. Testens endepunkt er hæmning af væksten, der er udtrykt som den logaritmiske stigning i målevariablen (den gennemsnitlige specifikke vækshastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke vækshastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og denne betegnes E_rC_x (f.eks. E_rC_{50}).

7. I denne metode anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelser i visse lande. Udbyttet defineres som værdien af målevariablene ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variablene ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning på x % (f.eks. 50 %) af udbyttet, og denne betegnes E_yC_x (f.eks. E_yC_{50}).

▼M6

8. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Der skal foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testsubstratet.

10. Af oplysninger om testkemikaliet, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, renhed, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, pK_a, K_{ow}, damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikalie i løbet af testperioden. Derved fås en indikation af, om der skal træffes særlige skridt til at kontrollere sådanne tab. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse under testbetingelserne, dvs. med samme næringssubstrat, temperatur og belysning som i testen.

11. Når regulering af testsubstratets pH er særlig vigtig, f.eks. ved testning af metaller eller hydrolytisk ustabile kemikalier, anbefales det at tilsætte en buffer til næringssubstratet (se punkt 21). I (8) findes der yderligere vejledning i testning af kemikalier, hvis fysisk-kemisk egenskaber vanskeliggør testning.

TESTENS VALIDITET

12. For at testen er valid, skal fordoblingstiden for bladantallet i kontrollen være mindre end 2,5 dage (60 t.), tilnærmelsesvis svarende til en syvdobling på syv dage eller en gennemsnitlig specifik vækshastighed på 0,275 d^{-1}. Med de testsubstrater og testbetingelser, der er beskrevet i denne testmetode, kan dette kriterium opfyldes ved at gennemføre testen under statiske betingelser (5). Kriteriet forventes desuden at kunne opfyldes under semistatiske forhold og med gennemstrømning. Beregningen af fordoblingstiden er vist i punkt 49.

REFERENCEKEMIKALIE

13. Til kontrol af testmetoden kan der testes et eller flere referencekemikalier, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (7). Det tilrådes, at testning af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testningsfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

14. Alt udstyr, der kommer i berøring med testsubstraterne, skal være udført helt i glas eller et andet kemisk inaktivt materiale. Glasapparatur, der anvendes til dyrkning og testning, skal være renset for kemiske kontaminanter, der kan udvaskes i testsubstratet, og skal være sterilt. Testbeholderne skal være tilstrækkeligt vide til, at blade fra forskellige kolonier i kontrolbeholderne kan vokse uden at overlappe hinanden ved testens slutning. Rødderne må

▼M6

gerne røre bunden af testbeholderen, men en mindste dybde på 20 mm og et mindste rumfang på 100 ml i hver testbeholder tilrådes. Valget af testbeholder er ikke afgørende, når blot disse krav er opfyldt. Bægerglas, krystallisationsskåle eller petriskåle af glas med passende mål har alle vist sig velegnede. Testbeholderne skal have låg, der nedsætter fordampning og utilsigtet kontaminering til et minimum og samtidig tillader det nødvendige luftskifte. Testbeholderne, og især disses låg, må ikke skygge eller ændre lysets spektrale sammensætning.

15. Kulturerne og testbeholderne må ikke opbevares sammen. Dette opnås bedst ved, at vækstkamre, inkubatorer eller lokaler er separate. Belysning og temperatur skal kunne reguleres og holdes på et konstant niveau (se punkt 35-36).

Testorganisme

16. Som testorganisme anvendes i denne test enten Lemna gibba eller Lemna minor. Tillæg 2 indeholder en kort beskrivelse af de arter af andemad, der er blevet anvendt til toksicitetstestning. Plantemateriale kan fås fra en kultursamling, fra et andet laboratorium eller i felten. Er planterne indsamlet i felten, skal de opbevares i mindst otte uger i kultur i samme substrat, som benyttes til testningen, før de anvendes. Indsamlingssteder for startkulturer i felten skal være fri for åbenlyse forureningskilder. Hvis de leveres fra et andet laboratorium eller en kultursamling, skal de opbevares på tilsvarende måde i mindst tre uger. Kilden til plantematerialet og den testede art og klon (hvis denne kendes) skal altid rapporteres.

17. Der skal anvendes monokulturer, som er fri for synlig kontaminering med andre organismer såsom alger og protozoer. Sunde planter af L. minor består af kolonier på mellem to og fem blade, mens sunde kolonier af L. gibba kan bestå af op til syv blade.

18. De testede planters kvalitet og ensartethed har stor indflydelse på testresultatet, hvorfor de bør udvælges nøje. Der skal anvendes unge, hurtigtvoksende planter uden synlige forandringer eller misfarvning (chlorose). Kulturer af god kvalitet er kendetegnet ved en høj andel af kolonier med mindst to blade. Et stort antal enkeltblade er tegn på miljøbelastning som f.eks. begrænset adgang til næringsstoffer, og plantemateriale fra sådanne kulturer bør ikke anvendes til testning.

Dyrkning

19. For at undgå at skulle vedligeholde kulturerne så ofte (f.eks. når Lemna-test ikke påtænkes anvendt i en periode), kan kulturerne opbevares ved reduceret belysning og temperatur (4-10 °C). En nærmere beskrivelse af dyrkningen er givet i tillæg 3. Hvis der er tydelige tegn på kontaminering med alger eller andre organismer, kan det være nødvendigt at udtage en delprøve af Lemna-blade, som overfladesteriliseres og derefter overføres til frisk substrat (se tillæg 3). I så fald kasseres resten af den kontaminerede kultur.

20. Mindst syv dage før testning overføres et tilstrækkeligt antal kolonier aseptisk til frisk, sterilt substrat og dyrkes i 7-10 dage under testbetingelserne.

Testsubstrat

21. Der anbefales forskellige substrater til Lemna minor og Lemna gibba som beskrevet nedenfor. Det må nøje overvejes, om der skal anvendes pH-buffer i testsubstratet (MOPS (4-morpholinpropansulfonsyre, CAS-Nr.: 1132-61-2) i L. minor-substrat og $NaHCO_3$ i L. gibba-substrat), hvis det mistænkes for at kunne reagere med testkemikaliet og påvirke tegnene på dets toksicitet. Steinberg-substrat (9) er ligeledes acceptabelt, når blot validitetskriterierne er opfyldt.

▼M6

22. Til dyrkning af og testning med L. minor anbefales en modificeret version af Lemna-næringssubstratet efter svensk standard (SIS). Sammensætningen af dette substrat er givet i tillæg 4.

23. Til dyrkning af og testning med L. gibba anbefales næringssubstratet 20X-AAP, som er beskrevet i tillæg 4.

24. Steinberg-substratet, som beskrives i tillæg 4, er også velegnet til L. minor og kan desuden bruges til L. gibba, når blot validitetskriterierne er opfyldt.

Testopløsninger

25. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningerne af testkemikaliet fremstilles normalt ved opløsning af kemikaliet i næringssubstrat.

26. Den højeste testede koncentration af testkemikaliet skal sædvanligvis ikke være større end kemikaliets vandopløselighed under testbetingelserne. Det skal dog bemærkes, at Lemna spp. flyder ovenpå og kan blive eksponeret for kemikalier, som samler sig i grænsefladen mellem vand og luft (f.eks. kemikalier, der er tungtopløselige i vand, hydrofobe eller overfladeaktive). Under sådanne omstændigheder vil eksponeringen skyldes andet materiale end det opløste materiale, og alt efter testkemikaliets egenskaber kan testkoncentrationerne være større end opløseligheden i vand. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliet ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikalie til testsubstratet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne midler bør på enhver måde søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler må ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal dets slutkoncentration rapporteres og holdes så lav som mulig (≤ 100 µl/l), og der skal være samme koncentration af opløsnings- eller dispergeringsmiddel i alle behandlings- og kontrolgrupper. Nærmere anvisninger kan findes i (8).

Test- og kontrolgrupper

27. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til teststoffets toksicitet for Lemna, f.eks. fra en test til bestemmelse af dosisinterval. I den endelige toksicitetstest skal der normalt være mindst fem teststofkoncentrationer, der danner en geometrisk række. Kvotienten mellem testkoncentrationerne skal helst ikke være over 3,2, men kan dog være større, når koncentrationsresponskurven er flad. Anvendes færre end fem koncentrationer, skal dette begrundes. Der skal anvendes mindst tre replikater for hver testkoncentration.

28. Ved fastsættelse af området for testkoncentrationerne (i det indledende forsøg og/eller i den endelige toksicitetstest) skal følgende tages i betragtning:

— En EC_x-værdi skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den kan bestemmes med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC_{50}-værdi skal den højeste testkoncentration således være større end EC_{50}-værdien. Ligger EC_{50}-værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit.

— Hvis målet er at bestemme en LOEC-/NOEC-værdi, skal den laveste testkoncentration være så lav, at væksten ikke er væsentligt lavere end i kontrollen. Desuden skal den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrollen. Er det ikke tilfældet, må

▼M6

testen gentages med et andet koncentrationsområde (medmindre den højeste koncentration svarer til opløselighedsgrænsen eller til den maksimalt krævede grænsekoncentration, f.eks. 100 mg/l).

29. Hver test skal omfatte kontroller med samme næringssubstrat, samme antal blade og kolonier og samme miljøbetingelser og procedurer som testbeholderne, men uden testkemikalie. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal der indgå en ekstra kontrolbehandling med samme koncentration af opløsnings-/dispergeringsmiddel som i testbeholderne med testkemikalie. Antallet af kontrolreplikater (og, i givet fald, prøver med opløsningsmiddel) skal mindst være lig antallet af beholdere for hver testkoncentration, og ideelt dobbelt så stort.

30. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal dog være mindst tre replikater af kontrollerne.

Eksponering

31. Kolonier bestående af 2 til 4 synlige blade overføres fra podekulturen i vilkårlig rækkefølge til testbeholderne under aseptiske betingelser. Hver testbeholder skal indeholde i alt 9 til 12 blade. Der skal være samme antal blade og kolonier i hver testbeholder. Erfaringerne med brugen af metoden og oplysninger fra ringtest har vist, at tre replikater pr. behandling med 9 til 12 blade som startværdi i hver replikat er tilstrækkeligt til at påvise vækstforskelle mellem behandlingerne svarende til en hæmning på 4 til 7 %, beregnet som væksthastighed (10 til 15 %, beregnet som udbytte) (7).

32. Testbeholdernes placering i inkubatoren skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur. Desuden skal testen enten have blokdesign, eller også skal testbeholderne omplaceres vilkårligt ved hver observation (eller hyppigere).

33. Hvis en indledende stabilitetstest viser, at testkemikaliekoncentrationen ikke kan opretholdes (dvs. den målte koncentration kommer ned under 80 % af den målte startkoncentration) gennem hele testperioden (syv dage), anbefales et semistatisk testregime. Dette gennemføres ved, at kolonierne eksponeres for friskfremstillede test- og kontroloplosninger mindst to gange i løbet af testen (f.eks. på dag 3 og 5). Hyppigheden af eksponeringen for frisk substrat afhænger af testkemikaliets stabilitet. Meget ustabile eller flygtige kemikalier kan kræve hyppigere eksponering, for at koncentrationerne kan holdes tilnærmelsesvis konstante. I visse tilfælde kan det være nødvendigt at bruge en gennemstrømningsmetode (8)(10).

34. Eksponeringsscenariet ved påføring på bladene (spray) er ikke omhandlet i denne metode. Der henvises i stedet til (11).

Inkuberingsbetingelser

35. Belysningen skal være konstant og komme fra lysstofrør med »warm« eller »cool white« lys med en styrke, der vælges i området 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, målt i det fotosyntetisk aktive spektrum (400-700 nm) i punkter med samme afstand fra lyskilden som bladene af Lemna (svarende til 6 500-10 000 lux). Lysstyrken over testområdet må ikke afvige mere end ± 15 % fra den valgte

▼M6

lysstyrke. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevne.

36. Temperaturen i testbeholderne skal være 24 °C ± 2 °C. Kontrolsubstratets pH må højst stige med 1,5 enhed under testen. Dog vil en afvigelse på mere end 1,5 enhed ikke gøre testen ugyldig, hvis det kan dokumenteres, at validitetskriterierne er opfyldt. I særlige tilfælde, f.eks. testning af ustabile kemikalier eller metaller, må der udvises ekstra opmærksomhed over for pH-afvigelse. Nærmere vejledning er givet i (8).

Varighed

37. Testen afsluttes syv dage efter, at planterne er overført til testbeholderne.

Målinger og analytiske bestemmelser

38. Ved testens begyndelse tælles og registreres antallet af blade i testbeholderne, idet der sørges for, at fremstående, klart synlige blade medtages. Antal blade med normalt og unormalt udseende bestemmes ved testens begyndelse, mindst hvert tredje døgn i løbet af eksponeringsperioden (dvs. mindst to gange i løbet af testperioden på syv dage) samt ved testens slutning. Ændringer i planternes udvikling, f.eks. i bladstørrelse, udseende, tegn på nekrose, chlorose eller opsvulmethed, opbrydning af kolonierne eller tab af disses flydeevne, samt i røddernes længde og udseende skal registreres. Særlige kendetegn ved testsubstratet (f.eks. uopløst materiale i testbeholderen eller algevækst på denne) skal ligeledes registreres.

39. Foruden at bladantallet registreres under testen, vurderes testkemikaliets virkninger på en (eller flere) af følgende målevariable:

i) totalt bladareal

ii) tørvægt

iii) frisk vægt.

40. Bestemmelse af det totale bladareal har den fordel, at det kan bestemmes for hver testbeholder og kontrolbeholder både ved testens start, under testen og ved dens slutning. Den tørre og friske vægt bestemmes ved testens start på en prøve af podekulturen, der er repræsentativ for den, der anvendes til at igangsætte testen, samt ved testens slutning med plantemateriale fra hver test- og kontrolbeholder. Hvis der ikke måles bladareal, er tørvægt at foretrække frem for frisk vægt.

41. Bestemmelse af totalt bladareal, tørvægt og frisk vægt kan foretages således:

i) *Totalt bladareal:* Det totale bladareal af alle kolonier kan bestemmes ved billedanalyse: Der kan afbildes en silhuet af testbeholder og planter med et videokamera (idet beholderen anbringes på en lyskasse), og det resulterende billede digitaliseres. Derefter kan det totale bladareal i testbeholderen bestemmes ved kalibrering med flade former med kendt areal. Det skal sikres, at interferens udelukkes fra testbeholderens rand. En alternativ, men mere omstændelig metode er at fotokopiere testbeholdere og planter, klippe den resulterende silhuet af kolonierne ud og bestemme arealet med en bladareal-analysator eller ved hjælp af millimeterpapir. Også andre teknikker kan anvendes (f.eks. vejning af papiret svarende til silhuetten og sammenholdelse med et enhedsareal).

▼**M6**

ii) *Tørvægt:* Alle kolonier indsamles fra hver testbeholder og skylles med destilleret eller deioniseret vand. De duppes fri for overskydende vand og tørres derefter ved 60 °C, til vægten er konstant. Eventuelle rodstumper skal medtages. Tørvægten skal angives med en nøjagtighed på mindst 0,1 mg.

iii) *Frisk vægt:* Alle kolonier overføres til på forhånd vejede rør af polystyren (eller andet inert materiale), hvis afrundede bund er forsynet med et lille hul (1 mm). Rørene centrifugeres derefter ved 3 000 omdr./min. i 10 minutter ved stuetemperatur. Rørene, der indeholder de nu tørrede kolonier, vejes igen, og den friske vægt beregnes ved fratrækning af vægten af de tomme rør.

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

42. Hvis testen udføres statisk, skal pH for hver behandling måles ved testens start og slutning. Udføres testen semistatisk, foretages pH-måling på hver portion »frisk« testopløsning før hver udskiftning foruden på de tilsvarende »brugte« opløsninger.

43. Lysintensiteten skal måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet i punkter med samme afstand til lyskilden som Lemna-bladene. Målingerne foretages mindst en gang i løbet af testen. Mindst en gang dagligt måles temperaturen af substratet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet.

44. Under testen bestemmes testkemikaliekoncentrationerne med passende intervaller. Mindstekravet i statistiske test er bestemmelse af koncentrationerne ved testens start og slutning.

45. I semistatiske test, hvor testkemikaliekoncentrationen ikke forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle friskfremstillede testopløsninger, og de samme opløsninger analyseres ved hver udskiftning (se punkt 33). For de test, hvor den målte startkoncentration af testkemikaliet ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver testkemikaliekoncentrationen før udskiftning kun bestemmes på en testbeholderreplikat ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).

46. For gennemstrømningstest vil det være hensigtsmæssigt med en prøvetagningsplan svarende til den, der er beskrevet for semistatiske test, herunder analyse ved testens start, undervejs og ved testens slutning, men måling af »brugt« testopløsning er ikke hensigtsmæssig i dette tilfælde. I sådanne test skal flowhastigheden af fortyndingsmiddel og testkemikalie eller testkemikaliestamopløsning kontrolleres dagligt.

47. Hvis det kan konstateres, at testkemikaliekoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end ± 20 %, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (8).

▼M6

Grænsetest

48. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikaliet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier finder anvendelse på en grænsetest, bortset fra at antallet af behandlingsreplikater skal fordobles. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

DATA OG RAPPORTERING

Fordoblingstid

49. Til bestemmelse af fordoblingstiden *(T_d) for bladantallet og forsøgets overensstemmelse med dette validitetskriterium (punkt 12) anvendes følgende formel på de data, der er indsamlet for kontrolbeholderne*:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

hvor μ er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, der bestemmes som beskrevet i punkt 54-55.

Responsvariable

50. Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på den vegetative vækst af Lemna. I nærværende testmetode beskrives to responsvariable, da præferencer og myndighedskrav er forskellige i forskellige lande. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle lande, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariable a) og b).

a) *Gennemsnitlig specifik væksthastighed:* Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i bladantallet samt den logaritmiske ændring i en anden måleparameter (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) med tiden (udtrykt pr. dag) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Den kaldes undertiden relativ væksthastighed (12).

b) *Udbytte:* Denne responsvariabel beregnes på grundlag af ændringen i bladantallet og desuden ændringen i en anden måleparameter (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe indtil testens slutning.

51. Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og at forskellen mellem dem må haves for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (E_rC_x) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte (E_yC_x), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik væksthastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for andemad i ikke-begrænsede kulturer,

▼M6

idet toksiciteten vurderes på grundlag af virkningerne på vækshastigheden og ikke afhænger af den absolutte størrelse af den specifikke vækshastighed af kontrollen, koncentrationsresponskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariablen for udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variable. E_yC_x afhænger af den specifikke vækshastighed af de arter af andemad, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke vækshastighed, som kan variere mellem de forskellige arter og endda kloner. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer mellem forskellige arter af andemad, endsige forskellige kloner. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke vækshastighed, indeholder nærværende testmetode toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse lande.

52. Beregningen af toksicitet skal baseres på bladantal og mindst en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), da visse kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end bladantallet. Denne virkning ville ikke blive opdaget ved beregning af bladantallet alene.

53. Bladantallet og eventuelle andre registrerede målevariable, dvs. totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt, samles i en tabel sammen med testkemikaliekoncentrationerne for hvert målepunkt. Den efterfølgende dataanalyse, f.eks. beregning af estimater for LOEC, NOEC eller EC_x, skal baseres på værdierne for de enkelte replikater og ikke beregnede gennemsnit for hver behandlingsgruppe.

Gennemsnitlig specifik vækshastighed

54. Den gennemsnitlige specifikke vækshastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i vækstvariablene — bladantal og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) — ved hjælp af nedenstående udtryk for hver replikat af kontrol og behandlingsprøve:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

hvor:

— μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke vækshastighed i tidsrummet fra i til j

— N_i er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

— N_j er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

— t er tidsrummet fra i til j.

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig vækshastighed samt estimater for variansen.

55. Den gennemsnitlige specifikke vækshastighed skal beregnes for hele testperioden (tiden »i« i ovenstående formel er testens starttid, og tiden »j« er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke vækshastighed samt estimater for variansen. Derudover foretages en trinvis beregning af vækshastigheden for at vurdere testkemikaliets virkninger i eksponeringsperioden (f.eks. ved betragtning af logaritmisk transformerede vækstkurver). Væsentlige forskelle mellem den trinvist beregnede vækshastighed og den gennemsnitlige vækshastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig. I så fald kan et forsigtigt skøn opstilles ved at sammenholde de specifikke vækshastigheder fra behandlede kulturer i det tidsrum, hvor hæmningen er maksimal, med de tilsvarende værdier for kontroller i samme tidsrum.

56. Hæmningen i procent af vækshastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

hvor:

— % I_r: er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke vækst-hastighed

— μ_C: er gennemsnitsværdien af μ i kontrollen

— μ_T: er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen.

Udbytte

57. Virkningerne på udbyttet bestemmes på grundlag af to målevariable, bladantallet og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt) i hver testbeholder ved testens start og slutning. For tørvægt og frisk vægt bestemmes startbiomassen på grundlag af en prøve af blade, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pode testbeholderne (se punkt 20). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent (% I_y) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

hvor:

— % I_y er udbyttereduktionen i procent

— b_C er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen

— b_T er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen.

Optegning af koncentrationsresponskurver

58. Der afsættes koncentrationsresponskurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_r eller I_y, beregnet som vist i punkt 56 eller punkt 57) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

59. Estimaterne for EC_x (f.eks. EC_{50}) baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed (E_rC_x), dels af udbytte (E_yC_x), der hver især er baseret på bladantal og en anden målevariabel (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt). Dette skyldes, at der findes testkemikalier med forskellig virkning på bladantallet og på de øvrige målevariable. Som parametre for toksicitet er der derfor fire EC_x-værdier for hvert beregnet hæmningsniveau x: E_rC_x (bladantal), E_rC_x (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt), E_yC_x (bladantal) og E_yC_x (totalt bladareal, tørvægt eller frisk vægt).

Statistiske metoder

60. Målet er at formulere den kvantitative koncentrationsresponssammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene, til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (13), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind

▼M6

i analysen (13). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne benyttes til data for vækshastighed eller biomasse. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x-værdier ud fra kontinuerte data findes i henvisning (14),(15) og (16).

61. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes sammenhængen mellem koncentration og respons til at beregne punktestimater for EC_x-værdier. Når det er muligt, skal 95 % konfidensgrænser bestemmes for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages på responsværdierne for de enkelte replikater, ikke på behandlingsgruppegennemsnit.

62. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (17).

63. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan være nyttig (18)(19)(20)(21). Det må vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (22). Hertil kan Levenes eller Bartletts test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (16).

64. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater EC_x. Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne Lemna-test. Et område på 10 til 20 % synes imidlertid at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20}.

Rapportering

65. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed

— kemiske identifikationsdata (f.eks. CAS-nr.), herunder renhed (urenheder).

Testede arter:

— videnskabeligt navn, klon (hvis den kendes) og kilde.

Testbetingelser:

— den anvendte testmetode (statisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)

— startdato og varighed for testen

— testsubstrat

— beskrivelse af forsøgsdesign: testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, antal kolonier og blade pr. testbeholder ved testens start

— testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration

▼**M6**

— metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler

— testtemperatur

— lyskilde, lysintensitet og -homogenitet

— test- og kontrolsubstraternes pH-værdi

— testkemikaliekoncentrationer og analysemetoder med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne)

— metoder til bestemmelse af bladantal og andre målevariable, f.eks. tørvægt, frisk vægt og bladareal

— alle fravigelser af nærværende testmetode.

Resultater:

— rådata: antal blade og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse

— gennemsnit og standardafvigelse for hver målevariabel

— vækstkurver for hver koncentration (brug af logaritmisk transformerede målevariable anbefales, se punkt 55)

— fordoblingstid/væksthastighed i kontrollen, baseret på bladantal

— beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne

— grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning

— estimater for toksicitetsendepunkter for responsvariablene, f.eks. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)

— enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling

— ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

(1) ASTM International (2003), Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3, E 1415-91 (Reapproved 1998), s. 733-742. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology, Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation (1996), XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, s. 10 ff.

(4) SSI — Swedish Standards Institute (1995), Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed, SS 02 82 13, s. 15 ff. (på svensk).

▼M6

(5) Environment Canada (1999), Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*, EPS 1/RM/37 — s. 120 ff.

(6) Environment Canada (1993), Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation, Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) I. Sims, P. Whitehouse og R. Lacey (1999), The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test, Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003, WRc plc — Environment Agency.

(8) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

(9) International Organization for Standardization. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) C. T. Walbridge (1977), A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.), Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108, september 1977.

(11) W. L. Lockhart, B. N. Billeck og C. L. Baron (1989), Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate, *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.

(12) D.B. Huebert og J.M. Shay (1993), Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) E. R. Christensen og N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*, 19, 713-718.

(14) N. Nyholm, P. S. Sørensen, K. O. Kusk og E. R. Christensen (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

(17) T. J. Norberg-King (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20, 482-491.

(20) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, 27: 103-117.

(21) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, 28: 519-531.

(22) P. Brain og R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner og forkortelser anvendes i denne testmetode:

Biomasse er tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test måles typisk surrogater for biomasse, f.eks. bladantal eller bladareal, og betegnelsen »biomasse« benyttes således også for sådanne surrogatmålinger.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Chlorose er gulning af bladvæv.

Klon er en organisme eller celle, der er opstået af en enkelt celle ved vegetativ formering. Individer fra samme klon er derfor genetisk identiske.

Koloni er en samling af moder- og datterblade (sædvanligvis 2 til 4), der sidder fast på hinanden. Betegnes undertiden en plante.

EC_x er den koncentration af testkemikalie opløst i testsubstratet, der medfører en væksthæmning på x % (f.eks. 50 %) af Lemna i løbet af en nærmere bestemt eksponeringsperiode (som udtrykkeligt skal angives, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis vækshastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for vækshastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. »E_rC (bladantal)«.

Gennemstrømningstest er en test, hvor testopløsningen udskiftes kontinuerligt.

Blad er en individuel/enkelt »bladlignende« struktur hos andemadplanten. Det er den mindste individuelle enhed, der kan formere sig.

Opsvulmethed er blade, der fremtræder udbulede eller opsvulmede.

Vækst er en stigning i en målevariabel i løbet af testperioden, f.eks. bladantal, tørvægt, vådvægt eller bladareal.

Væksthastighed (gennemsnitlig specifik væksthastighed) er den logaritmiske biomasseforøgelse i eksponeringsperioden.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) er den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning, der mindst svarer til den, der iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariable er enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. I denne metode er bladantal, bladareal, frisk vægt og tørvægt målevariable.

Monokultur er en kultur med en planteart.

Nekrose er dødt (dvs. hvidt eller gennemblødt) bladvæv.

Nuleffektkoncentration (No Observed Effect Concentration, NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

Fænotype er de observerbare kendetegn for en organisme, som er bestemt af samspillet mellem dens gener og dens omgivelser.

Responsvariable er variable, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af målte parametre, der beskriver biomassen ved forskellige beregningsmetoder. I nærværende testmetode er vækshastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som bladantal, bladareal, frisk vægt eller tørvægt.

▼**M6**

Semistatisk test (udskiftningstest) er en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test er en testmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Endepunkt for en test er den generelle faktor, som testkemikaliet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne testmetode er endepunktet vækshæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testsubstrat er det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testsubstratet.

Udbytte er værdien af en målevariabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start.

▼M6

Tillæg 2

Beskrivelse af Lemna spp.

Vandplanten med trivialnavnet andemad, Lemna spp., tilhører familien Lemnaceae, der omfatter en række arter, som er udbredt over hele verden og består af fire slægter. Deres respektive udseende og taksonomi er beskrevet udtømmende (1)(2). Lemna gibba og L. minor er repræsentative arter fra tempererede områder og finder almindelig anvendelse i toksicitetstest. Begge arter har flydende eller nedsænket skiveformet stilk (blad) og en meget tynd rod, der udgår fra midten af undersiden på hvert blad. Lemna spp. danner sjældent blomster, og planterne formerer sig vegetativt ved at skyde nye blade (3). De unge planter er blegere og har kortere rødder end de ældre planter og består af to-tre blade af forskellig størrelse. Lemnas enkle struktur, ukønnede formering og korte generationstid gør planten meget velegnet til laboratorietest (4)(5).

På grund af artsbetingede forskelle i følsomhed er sammenligning af følsomhed kun gyldig inden for samme art.

Eksempler på arter af Lemna, der er blevet anvendt til testning (henvisninger vedrørende de forskellige arter):

Lemna aequinoctialis: B. Eklund (1996), The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays, Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2, Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: N. A. Clark (1925), The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light, J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996), XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, s. 10 ff.

Swedish Standards Institute (SIS) (1995), Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed, SS 02 82 13, s. 15 ff. (på svensk).

Lemna gibba: ASTM International (2003), Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3, E 1415-91 (Reapproved 1998), s. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996), OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«, EPA 712-C-96-156, s. 8 ff.

Lemna paucicostata: Y. Nasu og M. Kugimoto (1981), *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: J. R. Clark et al. (1981), Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla),* Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: D. B. Huebert og J. M. Shay (1993), Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds, Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: T. C. Hutchinson og H. Czyrska (1975), Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds, Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Kilder til Lemna-arter

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tlf.: +1-416-978-3641
Fax: +1-416-978-5878
E-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
USA
Tlf.: +1 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SVERIGE
Tlf.: +46 8 674 7240
Fax: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Tyskland
E-mail: lemna@uba.de

LITTERATUR

(1) W. S. Hillman (1961), The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature, The Botanical Review, 27:221-287.

(2) E. Landolt (1986), Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*), Vol. 2, Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) G. Björndahl (1982), Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family), ISBN 82-991150-0-0, The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) W. Wang (1986), Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed, Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) W. Wang (1990), Literature review on duckweed toxicity testing, Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

Tillæg 3

Opbevaring af stamkulturen

Ved lavere temperatur (4-10 °C) kan stamkulturer holdes i længere tid uden at skulle gendannes. Næringssubstratet til Lemna kan være det samme som det, der anvendes ved testning, men andre næringsrige substrater kan anvendes til stamkulturer.

Med jævne mellemrum udtages et antal unge, lysegrønne planter og overføres aseptisk til nye dyrkningsbeholdere med frisk substrat. Under de her foreslåede køligere forhold kan dyrkning af subkulturer ske med op til tre måneders mellemrum.

Der skal anvendes kemisk rene (syrevaskede) og sterile dyrkningsbeholdere af glas samt aseptisk håndtering. Hvis en stamkultur bliver kontamineret med f.eks. alger eller svampe, må der foretages indgreb til at eliminere kontaminanten. For algers og de fleste andre kontaminanters vedkommende kan dette opnås ved overfladesterilisation. Der udtages en prøve af det kontaminerede plantemateriale, og rødderne klippes bort. Materialet omrystes derefter kraftigt med rent vand, efterfulgt af nedsænkning i en 0,5 % (v/v) opløsning af natriumhypochlorit i mellem 30 sekunder og 5 minutter. Plantematerialet skylles derefter med sterilt vand og overføres i et par portioner til dyrkningsbeholdere indeholdende frisk næringssubstrat. Mange af bladene vil dø som følge af denne behandling, specielt hvis der anvendes længere eksponeringsperioder, men nogle af de overlevende vil sædvanligvis være fri for kontaminering. Disse kan derefter bruges til podning af nye kulturer.

▼M6

Tillæg 4

Substrater

Der anbefales forskellige næringssubstrater til L. minor og L. gibba. Til L. minor anbefales et modificeret substrat efter Swedish Standard (SIS), mens substratet 20X AAP anbefales til L. gibba. Nedenfor er sammensætningen af de to substrater angivet. Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Lemna-næringssubstrat efter Swedish Standard (SIS)

— Stamopløsning I-V steriliseres ved autoklavering (120 °C, 15 min.) eller ved membranfiltrering (porediameter ca. 0,2 μm).

— Stamopløsning VI (og valgfrit VII) steriliseres kun ved membranfiltrering og må ikke autoklaveres.

— Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Stamopløsning I-V skal kasseres efter seks måneder, mens holdbarheden for stamopløsning VI (og valgfrit VII) er en måned.

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløs-ningen (g/l)	Koncentration i færdigt substrat (mg/•l)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2.3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $\cdot 2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffer)	490	490	—	—

Til fremstilling af en liter SIS-substrat tilsættes følgende til 900 ml deioniseret vand:

▼**M6**

— 10 ml stamopløsning I

— 5 ml stamopløsning II

— 5 ml stamopløsning III

— 5 ml stamopløsning IV

— 1 ml stamopløsning V

— 5 ml stamopløsning VI

— 1 ml stamopløsning VII (valgfrit)

Bemærk: Til visse testkemikalier kan der yderligere være brug for en stamopløsning VII (MOPS-buffer) (se punkt 11).

pH justeres til 6,5 ± 0,2 med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til en liter med deioniseret vand.

20X AAP-næringssubstrat

Stamopløsninger fremstilles i sterilt, destilleret eller deioniseret vand.

Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Under disse betingelser vil stamopløsningerne have en holdbarhed på mindst 6-8 uger.

Der fremstilles fem næringssubstrat-stamopløsninger (A1, A2, A3, B og C) til 20X-AAP-substrat, idet der anvendes kemikalier af reagenskvalitet. Næringssubstratet fremstilles ved, at der tilsættes 20 ml af hver næringssubstrat-stamopløsning til ca. 850 ml deioniseret vand. pH justeres til 7,5 ± 0,1 med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til en liter med deioniseret vand. Substratet filtreres gennem et membranfilter med en porediameter på ca. 0,2 μm over i en steril beholder.

Det næringssubstrat, der skal bruges til testningen, skal fremstilles 1-2 dage før brug, for at pH kan stabiliseres. Næringssubstratets pH skal kontrolleres før brug og om nødvendigt justeres igen med 0,1 M eller 1 M NaOH eller HCl som beskrevet ovenfor.

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløsning (g/•l) (*)	Koncentration i færdigt substrat (mg/•l) (*)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Stamopløsning nr.	Stof	Koncentration i stamopløsning (g/•l) (*)	Koncentration i færdigt substrat (mg/•l) (*)	Færdigt substrat	
				Grundstof	Koncentration (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Medmindre noteret

NB: Den teoretisk mest passende endelige bicarbonatkoncentration (som vil overflødiggøre nævneværdig pH-justering) er 15 mg/l, ikke 300 mg/l. Den traditionelle brug af 20X-AAP-substrat og ringtesten i forbindelse med denne vejledning er imidlertid baseret på 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse og R. Lacey (1999), The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test, Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency).

STEINBERG-substrat (efter ISO 20079)

Koncentrationer og stamopløsninger

Det modificerede Steinberg-substrat anvendes i ISO 20079 til Lemna minor alene (da der deri kun tillades brug af Lemna minor), men også med Lemna gibba er der opnået gode testresultater.

Til fremstilling af substratet skal der anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

Næringssubstratet fremstilles af stamopløsninger eller af det 10-dobbelt koncentrerede substrat, som har den maksimale koncentration af substrat uden udfældning.

Tabel 1

pH-stabiliseret STEINBERG-substrat (modificeret efter Altenburger)

Komponent		Næringssubstrat	
Makronæringsstoffer	Molvægt	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Komponent		Næringssubstrat	
Mikronæringsstoffer	Molvægt	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatrium-dihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2

Stamopløsninger (makronæringsstoffer)

1. Makronæringsstoffer (50 gange koncentreret)	**g/l**
Stamopløsning 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Stamopløsning 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Stamopløsning 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabel 3

Stamopløsninger (mikronæringsstoffer)

2. Mikronæringsstoffer (1 000 gange koncentreret)	**mg/l**
Stamopløsning 4:	
H_3BO_3	120,0
Stamopløsning 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Stamopløsning 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Stamopløsning 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Stamopløsning 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatrium-dihydrat	1 500,00

— Stamopløsning 2 og 3 og 4 til 7 kan pooles hver for sig (idet de nødvendige koncentrationer tages i betragtning).

▼**M6**

— For at få opnå længere holdbarhed autoklaveres stamopløsningerne ved 121 °C i 20 min., eller sterilfiltreres (0,2 μm) som alternativ. Brug af sterilfiltrering (0,2 μm) tilrådes kraftigt til stamopløsning 8.

Fremstilling af den endelige koncentration af STEINBERG-substratet (modificeret)

— Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 900 ml deioniseret vand for at undgå udfældning.

— Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3).

— pH skal være 5,5 +/– 0,2 (justeres ved tilsætning af mindst mulig NaOH-opløsning eller HCl).

— Der fyldes op med vand til 1 000 ml.

— Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklavering (ved 121 °C i 20 min.).

Fremstilling af det 10-dobbelt koncentrerede STEINBERG-substrat (modificeret) til midlertidig opbevaring

— Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 30 ml vand for at undgå udfældning.

— Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3). Der fyldes op med vand til 100 ml.

— Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklavering (ved 121 °C i 20 min.).

— Substratets pH (i den endelige koncentration) skal være 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 218 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen Chironomus sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er baseret på de eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus tentans, der er blevet udviklet i Europa (1) (2) (3) og Nordamerika (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (10) (11).

2. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af sediment med teststoffet. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Scenariet med sedimentspiking har til formål at simulere akkumulerede niveauer af kemikalier i sedimentet. Dette eksponeringssystem omfatter spiking af sediment i et sediment/vand-testsystem.

3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log K_{ow} > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 28-65 dage for C. tentans. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabilt kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.

4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.

5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:

   — udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder

   — testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest

   — anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed.

6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

▼M4

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af testkemikaliet i sediment/vand-systemer. Teststoffet tilsættes sedimentet, og æglarverne overføres derefter til bægerglas, hvor sediment- og vandkoncentrationerne er blevet stabiliseret. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på × % i emergens, larveoverlevelse eller larvevækst (f.eks. EC_{15}, EC_{50} osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment samt stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)

— emergensen af C. riparius og C. yoshimatsui til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for C. tentans kræves der en periode på 20-65 dage

— ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas

— vandtemperaturen må højst variere med ± 1,0 °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

Testglas

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 cm^2 pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

Valg af fiskeart

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis Chironomus riparius. Chironomus tentans kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Chironomus yohimatsui kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende Chironomus riparius. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. Chironomus tentans (4) og Chironomus yoshimatsui (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret

b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm)

d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %

e) kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5. Det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

▼M4

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som $CaCO_3$. Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenet sediment

16. Forurenet sediment af den valgte koncentration fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af teststoffet tilsættes sedimentet direkte. En stamopløsning af teststoffet opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis teststoffet er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med 10 g fint kvartssand til et testglas. Vent, indtil opløsningsmidlet er fordampet, og fjern det helt fra sandet. Derefter blandes sandet med den passende mængde sediment pr. testglas. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Det sand, der findes i teststoffet og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment skal således fremstilles med mindre sand). Det skal sikres, at det teststof, der tilsættes sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bestemme homogeniteten.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives.

Design til regressionsanalyse

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{15}, EC_{50}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer (EC_x) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. Ekstrapolering langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).

▼M4

19. Hvis EC_x skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

Design til beregning af NOEC/LOEC

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at udføre en test ved en koncentration, der er høj nok til, at beslutningstagere kan udelukke mulige toksiske virkninger af teststoffet, og grænsen fastsættes til en koncentration, der ikke forventes at forekomme under nogen omstændigheder. 1 000 mg/kg (tørvægt) anbefales. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whithey-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Klargøring af forurenet sediment/vand-system

22. Den spiking-metode, der er beskrevet i testmetode C.8, Toksicitet for regnorme, anbefales til tilsætning af teststoffet (14). De »spikede« (forurenede) sedimenter anbringes i bægerglas, og overliggende vand tilsættes for at frembringe et volumenforhold mellem sediment og vand på 1:4 (se afsnit 11 og 15). Sedimentlaget skal have en dybde på 1,5-3 cm. For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

▼M4

Stabilisering

24. Når det forurenede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at teststoffet fordeler sig fra den vandige fase til sedimentet (3) (4) (6) (13). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger). Da mange kemikalier i dette tidsrum ville blive nedbrudt, afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer anbefales. Efter denne yderligere ækvilibreringstid måles koncentrationen af teststoffet i det overliggende vand, porevandet og sedimentet, som minimum ved den højeste koncentration og en lavere (se afsnit 38). Disse analyser af teststoffet gør det muligt at beregne massebalance og angive resultater baseret på målte koncentrationer.

Tilsætning af testorganismer

25. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for Chironomus riparius ved 20 °C og 1-4 dage for Chironomus tentans ved 23 °C og Chironomus yoshimatui ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).

26. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenet sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 25 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.

Testkoncentrationer

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.

28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

▼M4

Kontroller

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

Testsystem

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for C. yoshimatui) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log K_{ow} > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (Urtica dioica), morbærtræ (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens) eller spinat (Spinacia oleracea). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.

33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For C. tentans og C. yoshimatui anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

▼M4

Eksponeringsvarighed

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 65 dage for C. tentans. Hvis dansemyg udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

Observationer

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnet og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

Vækst og overlevelse

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 μm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tørvægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

Analysemålinger

Teststofkoncentration

38. Inden testen påbegyndes (dvs. inden larver tilsættes), udtages prøver af bulksediment fra mindst ét glas pr. behandling til analytisk bestemmelse af teststofkoncentrationen i sedimentet. Det anbefales, at prøver af som minimum det overliggende vand, porevandet og sedimentet analyseres ved begyndelsen (se afsnit 24) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet.

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

▼M4

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en χ^2-r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.

43. Effektkoncentrationer udtrykt og baseret på tørvægt beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).

44. For at beregne et punktestimat for EC_{50} eller en anden EC_x-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.

45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosis-respons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indicerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).

▼**M4**

Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, n_e, bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas

47. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binominal varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuerligt respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosisrespons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).

48. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus (sin^{-1}) af kvadratroden af ER.

49. I forbindelse med emergensforhold beregnes EC_x-værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

50. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning). Udviklingshastigheden er det reciprokke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuerligt respons kan EC_x-værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).

51. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag × og dag x-l (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas (x) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i: indeks for inspektionsinterval

m: maksimalt antal inspektionsintervaller

f_i: antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

n_e: det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget ($= \sum f_i$)

x_i: udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

hvor:

day_i: inspektionsdag (siden behandling)

l_i: længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Testrapport

52. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

Testart:

— anvendte testorganismer: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser

— information om håndtering af ægmasser og larver

— testorganismernes alder ved tilsætning til testglas.

Testbetingelser:

— anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment

— for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)

— fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)

— fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)

— dybde af sediment og overliggende vand

— volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand

▼M4

— testglas (materiale og størrelse)

— metode til sedimentspiking: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel

— stabiliserende ligevægtsfase for det spikede sediment/vand-system: varighed og betingelser

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset

— kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak

— evt. udskiftning af fordampet vand

— antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag

— antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas

— individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant

— procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)

— gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)

— estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. EC_x (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(15) Suedel BC og JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C og C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiked sediment eller forurenet sediment: sediment, som teststoffet er tilsat.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af Chironomus riparius

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkingsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

Fodring af larver

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.

5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.

6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

▼M4

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.

10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 og K_2HPO_4, idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

LITTERATUR

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
Kl	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.
(2) Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne. Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Tillæg 3

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

Sammensætning af sediment

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Karakteristika	% af sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4-5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonat	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledeevne ≤ 10 μS/cm	30-50

Fremstilling

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med $CaCO_3$. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

Opbevaring

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

LITTERATUR

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Tillæg 4

Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding

Stof	Koncentrationer
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

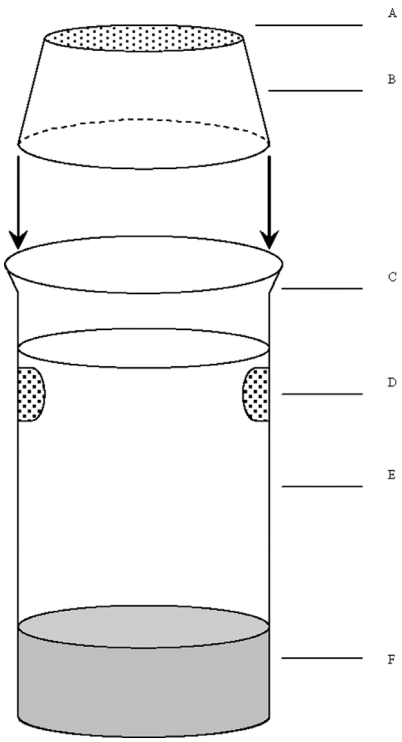
(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

▼**M4**

Tillæg 5

Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver

Emergensfiltre anbringes på testbægerglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:



A: Nylonvæv

B: Omvendte plastbægre

C: Eksponeringsbæger uden flange

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

E: Vand

F: Sediment

▼M4

C. 28. **TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET VAND**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD TG 219 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen Chironomus sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er primært baseret på BBA-vejledningen, der anvender et sediment- og vandtestsystem med syntetisk jord, og et vandsøjleeksponeringsscenario (1). Den inddrager også de eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus tentans, der er blevet udviklet i Europa og Nordamerika (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (10) (11).

2. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af vand. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Vandeksponeringsscenariet, hvor vandsøjlen spikes, har til formål at simulere et tilfælde af aerosolspredning af pesticider og dækker den første koncentrationstop i porevand. Det kan også anvendes i forbindelse med andre typer eksponering (herunder kemiske udslip) med undtagelse af akkumuleringsprocesser, der varer længere end testperioden.

3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log K_{ow} > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 28-65 dage for C. tentans. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabilt kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.

4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.

5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:

— udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder

— testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest

▼M4

— anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed toksicitetsdata fra test med naturlige og kunstige sedimenter var sammenlignelige for flere kemikalier (2).

6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af teststoffet i sediment/vand-systemer. Testen indledes med, at æglarver anbringes i testbægerglas, som indeholder sediment/vand-systemet, og derefter tilsættes teststoffet vandet. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på × % i emergens, larveoverlevelse eller larvevækst (f.eks. EC_{15}, EC_{50} osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment og stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)

— emergensen af C. riparius og C. yoshimatsui til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for C. tentans kræves der en periode på 20-65 dage

— ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas

▼M4

— vandtemperaturen må højst variere med ± 1,0 °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testglas

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 cm^2 pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

Valg af fiskeart

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis Chironomus riparius. Chironomus tentans kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Chironomus yohimatsui kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende Chironomus riparius. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. Chironomus tentans (4) og Chironomus yoshimatsui (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret

b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm)

d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %

e) kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5

f) det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

▼M4

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som $CaCO_3$. Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenet vand

16. Testkoncentrationer beregnes på grundlag af vandsøjlekoncentrationer, dvs. vandet over sedimentet. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger fremstilles fortrinsvis ved at opløse teststoffet i testmediet. Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Som opløsningsmiddel kan der benyttes acetone, ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Koncentrationen af opløselighedsfremmere i det færdige testmedium skal være så lille som muligt (dvs. $\leq$ 0,1 ml/l) og bør være den samme i alle behandlingsprøver. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må den ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig negativ virkning på chironomidlarven, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes. Der skal ydes enhver indsats for at undgå brugen af sådanne materialer.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives. Regressionsanalyse foretrækkes frem for hypotesetest.

Design til regressionsanalyse

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{15}, EC_{50}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer (EC_x) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. Ekstrapolering

▼M4

langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).

19. Hvis EC_x skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

Design til beregning af NOEC/LOEC

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at indicere, at teststoffets toksiske værdi er større end den testede grænsekoncentration. En anbefalet koncentration kan ikke foreslås i forbindelse med denne testmetode. Det overlades til myndighedernes vurdering. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whithey-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Klargøring af forurenet vand- og sedimentsystem

22. Passende mængder formuleret sediment (se afsnit 13-14 og tillæg 3) tilsættes testglasset, så der dannes et lag på mindst 1,5 cm. Vand tilsættes, så der fås en dybde på 6 cm (se afsnit 15). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af vandet må ikke overstige 1:4, og sedimentlaget må ikke være dybere end 3 cm. Sediment/vand-systemet hensættes til forsigtig beluftning i syv dage inden testorganismer tilsættes (se afsnit 14 og tillæg 3). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

▼M4

23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

Tilsætning af testorganismer

24. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for Chironomus riparius ved 20 °C og 1-4 dage for Chironomus tentans ved 23 °C og Chironomus yoshimatui ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).

25. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenet sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 24 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.

26. 24 timer efter tilsætning af larverne tilsættes teststoffet i den overliggende vandsøjle, og let beluftning tilføres igen. Små mængder af teststofopløsninger tilsættes under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet.

Testkoncentrationer

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.

28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

Kontroller

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

▼M4

Testsystem

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for C. yoshimatui) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log K_{ow} > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (Urtica dioica), morbærtræ (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens) eller spinat (Spinacia oleracea). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.

33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For C. tentans og C. yoshimatui anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

Eksponeringsvarighed

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 65 dage for C. tentans. Hvis dansemyg udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

OBSERVATIONER

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

▼M4

36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnet og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

Vækst og overlevelse

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 μm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tørvægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

Analysemålinger

Teststofkoncentration

38. Som minimum analyseres prøver af det overliggende vand, porevandet og sedimentet ved begyndelsen (helst en time efter tilsætning af teststoffet) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet. Prøvetagning af sediment ved begyndelsen af testen kan påvirke testsystemet (f.eks. fjerne testlarver), og derfor bør der anvendes yderligere testglas til udførelsen af analysebestemmelser ved begyndelsen af og i løbet af testen, hvis det er hensigtsmæssigt (se afsnit 39). Målinger i sediment er muligvis ikke nødvendige, hvis fordelingen af teststoffet mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i et vand- og sedimentforsøg under lignende betingelser (f.eks. forhold mellem vand og sediment, anvendelsestype og organisk kulstofindhold i sediment).

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

▼M4

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur samt opløst ilt i vandet måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en χ^2-r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.

43. Effektkoncentrationer udtrykt som koncentrationer i det overliggende vand beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).

44. For at beregne et punktestimat for EC_{50} eller en anden EC_x-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.

45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosis-respons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indicerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).

47. Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, n_e, bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas

48. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binominal varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuerligt respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosisrespons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).

49. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus (sin^{-1}) af kvadratroden af ER.

50. I forbindelse med emergensforhold beregnes EC_x-værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

51. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning.) Udviklingshastigheden er det reciprokke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuerligt respons kan EC_x-værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).

52. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag × og dag x-l (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas (x) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i: indeks for inspektionsinterval

m: maksimalt antal inspektionsintervaller

▼M4

f_i: antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

n_e: det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget ($= \sum f_i$)

x_i: udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

hvor:

day_i: inspektionsdag (siden behandling)

l_i: længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Testrapport

53. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

Testart:

— anvendte forsøgsdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser

— information om håndtering af ægmasser og larver

— forsøgsdyrenes alder ved tilsætning til testglas.

Testbetingelser:

— anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment

— for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)

— fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)

— fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)

— dybde af sediment og overliggende vand

— volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand

— testglas (materiale og størrelse)

— metode til fremstilling af stamopløsninger og testkoncentrationer

▼**M4**

— anvendelse af teststof: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset

— kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak

— evt. udskiftning af fordampet vand

— antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag

— antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas

— individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant

— procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)

— gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)

— estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. EC_x (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850,1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(15) Suedel BC og Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C og Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiked vand eller forurenet vand: vand, som teststoffet er tilsat.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius*

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkingsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

Fodring af larver

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.

5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.

6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

▼M4

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.

10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der er en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 og K_2HPO_4, idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
Kl	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.
(2) Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne

Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP og Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Tillæg 3

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

Sammensætning af sediment

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Karakteristika	% af sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4-5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 µm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonat	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledeevne ≤ 10 µS/cm	30-50

Fremstilling

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med $CaCO_3$. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

Opbevaring

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

LITTERATUR:

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Tillæg 4

Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding

Stof	Koncentrationer
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

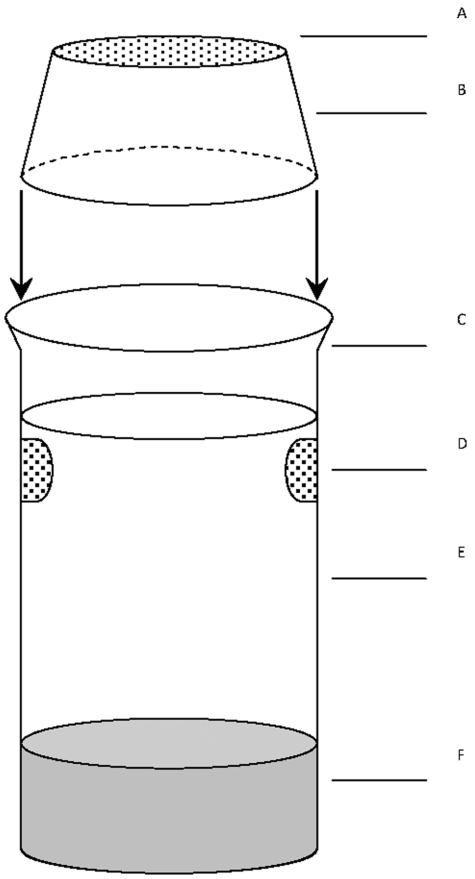
(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

▼M4

Tillæg 5

Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver

Emergensfiltre anbringes på testbægerglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:



A: Nylonvæv

B: Omvendte plastbægre

C: Eksponeringsbæger uden flange

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

E: Vand

F: Sediment

▼M4

C.29. LET BIONEDBRYDELIGHED — CO_2 I LUKKEDE BEHOLDERE (HEADSPACE-TEST)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 310 (2006). Denne testmetode er en screeningsmetode til evaluering af kemikaliers lette bionedbrydelighed og giver oplysninger, der svarer de oplysninger, der fås med de seks testmetoder, som er beskrevet i kapitel C.4 (A-F) i dette bilag. Et kemikalie, der giver positive resultater i forbindelse med denne testmetode, kan derfor betragtes som let bionedbrydeligt og derfor hurtigt nedbrydeligt i miljøet.

2. Den veletablerede kuldioxidmetode (CO_2) (1), der er baseret på Sturms originale test (2) til vurdering af organiske kemikaliers bionedbrydelighed, som måler den kuldioxid, der produceres ved mikrobiel aktivitet, har normalt været den foretrukne metode i forbindelse med test af tungtopløselige kemikalier og stærkt adsorberende kemikalier. Den er også blevet anvendt i forbindelse med opløselige (men ikke flygtige) kemikalier, da udviklingen af kuldioxid af mange betragtes som det eneste klare bevis for mikrobiel aktivitet. Eliminering af opløst organisk kulstof kan opnås ved hjælp af fysisk-kemiske processer — adsorption, fordampning, udfældning, hydrolyse — og ved hjælp af mikrobiel aktivitet, og mange ikke-biologiske reaktioner forbruger ilt. CO_2 produceres i sjældne tilfælde abiotisk fra organiske kemikalier. I den originale og tilpassede Sturm-test (1) (2) elimineres CO_2 fra væskefasen til de absorberende kar som følge »sparging« (dvs. luftbobler, der er behandlet til at eliminere CO_2 via det flydende substrat), mens CO_2 i Larsons version (3) (4) overføres fra reaktionsbeholderen til absorberne ved at lade CO_2-fri luft passere gennem headspace og ved også kontinuerligt at ryste testbeholderen. Kun i Larsons version rystes reaktionsbeholderen. Omrystning foreskrives kun for uopløselige stoffer i ISO 9439 (5) og i den originale amerikanske version (6), som begge foreskriver sparging i stedet for headspace-udskiftning. I en anden officiel amerikansk EPA-metode (7), som er baseret på Gledhills metode (8), er den omrystede reaktionsbeholder lukket for atmosfæren, og det producerede CO_2 opsamles i et indbygget alkalisk filter direkte fra gasfasen som i klassiske Warburg/Barcroft-respirometerkolber.

3. Det er påvist, at uorganisk kulstof akkumuleres i mediet ved anvendelse af den traditionelle tilpassede Sturm-test på en række kemikalier (9). En koncentration af uorganisk kulstof på så meget som 8 mg/l blev fundet under nedbrydningen af 20 mg C/l anilin. Opsamling af CO_2 i alkalifiltre gav derfor ikke et sandt billede af den mængde CO_2, der produceres mikrobiologisk på forskellige tidspunkter i løbet af nedbrydningen. Som følge deraf opfyldes forskriften om, at en teoretisk maksimal CO_2-produktion > 60 % skal opsamles inden for et »10-dages-vindue« (de 10 dage umiddelbart efter opnåelsen af 10 % bionedbrydning), for at et testkemikalie kan klassificeres som let bionedbrydeligt, ikke for visse kemikalier, der klassificeres som sådan ved hjælp af eliminering af opløst organisk kulstof (DOC).

4. Når den procentvise nedbrydning er en lavere værdi end forventet, akkumuleres uorganisk kulstof muligvis i testopløsningen. Bionedbrydelighed kan derefter vurderes med andre test for let bionedbrydelighed.

▼M4

5. På grund af andre ulemper ved Sturm-metoden (besværlig, tidskrævende, mere udsat for forsøgsfejl og ikke-anvendelig i forbindelse med flygtige kemikalier) har man tidligere forsøgt at finde en teknik med en lukket beholder — ud over Gledhills — i stedet for gasgennemstrømning (10) (11). Boatman et al. (12) gennemgik de tidligere metoder og anvendte et indesluttet headspace-system, hvor CO_2 blev frigivet til headspace ved slutningen af inkubationen gennem forsuring af mediet. CO_2 blev målt ved hjælp af gaskromatografi (GC)/analyse af uorganisk kulstof i automatisk udtagne prøver fra headspace, men opløst uorganisk kulstof (DIC) i væskefasen blev ikke taget i betragtning. De anvendte beholdere var desuden meget små (20 ml) og indeholdt kun 10 ml medium, hvilket gav problemer f.eks. ved tilsætning af de nødvendigvis meget små mængder uopløselige testkemikalier. Der kunne også være for få eller ingen mikroorganismer til stede i det inokulerede medium, som kan nedbryde testkemikalierne.

6. Disse vanskeligheder er blevet afhjulpet af de forsøg, som Struijs og Stoltenkamp (13) samt Birch og Fletcher (14) hver for sig har udført, idet sidstnævnte har været inspireret af erfaringer med apparatur anvendt i den anaerobe bionedbrydningstest (15). I den førstnævnte metode (13) måles CO_2 i headspace efter forsuring og ækvilibrering, mens DIC i sidstnævnte metode (14) måles i både gasfasen og væskefasen uden behandling. Over 90 % af det dannede uorganiske kulstof var til stede i væskefasen. Begge metoder har fordele i forhold til Sturm-testen, idet testsystemet var mere kompakt og håndterbart, flygtige kemikalier kan testes, og muligheden for forsinkelse i målingen af det producerede CO_2 undgås.

7. De to metoder blev kombineret i ISO Headspace CO_2-standarden (16), som blev ringtestet (17), og det er denne standard, der er grundlaget for denne testmetode. De to metoder er ligeledes blevet anvendt i den amerikanske EPA-metode (18). Der anbefales to metoder til måling af CO_2, nemlig CO_2 i headspace efter forsuring (13) og uorganisk kulstof i væskefasen efter tilsætning af yderligere alkali. Sidstnævnte metode blev introduceret af Peterson under CONCAWE-ringtesten (19) af denne headspace-metode med tilpasning til måling af iboende bionedbrydelighed. De ændringer, der blev foretaget i revisionen af metoderne i kapitel C.4 Bestemmelse af let bionedbrydelighed i dette bilag i 1992 (20), er indarbejdet i denne testmetode, således at betingelserne (medium, varighed osv.) i øvrigt er de samme som i den reviderede Sturm-test (20). Birch og Fletcher (14) har påvist, at næsten samme resultater blev opnået med denne headspace-test som med de samme kemikalier i OECD-ringtesten (21) af de reviderede testmetoder.

TESTENS PRINCIP

8. Som eneste kulstof- og energikilde inkuberes testkemikaliet, normalt ved 20 mg C/l, i et medium af bufrede mineralsalte, som er inokuleret med en blandet population af mikroorganismer. Testen udføres i lukkede flasker med headspace af luft, som skaber et iltreservoir til aerob bionedbrydning. CO_2-udviklingen som følge af den fuldstændige aerobe bionedbrydning af testkemikaliet bestemmes ved at måle det uorganiske kulstof, der produceres i testflaskerne, ud over det, der produceres i blindprøver, som kun indeholder inokuleret medium. Graden af bionedbrydning udtrykkes som en procentdel af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThIC) baseret på den mængde testkemikalie (som organisk kulstof), der oprindeligt blev tilsat.

9. DOC-eliminering og/eller graden af primær bionedbrydning af testkemikaliet kan også måles (20).

▼M4

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

10. Testkemikaliets organiske kulstofindhold (% w/w) skal kendes enten fra dets kemiske struktur eller ved måling, således at den procentvise nedbrydning kan beregnes. For flygtige testkemikalier kan en målt eller beregnet Henrys konstant bruges til at bestemme et hensigtsmæssigt forhold mellem headspace og væskevolumen. Information om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer kan bruges til at vælge en hensigtsmæssig testkoncentration og fortolke resultater, der påviser lav bionedbrydelighed. Kontrol for hæmning bør medtages, medmindre det er påvist, at testkemikaliet ikke hæmmer mikrobielle aktiviteter (se afsnit 24).

METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

11. Testen kan anvendes i forbindelse med vandopløselige og uopløselige testkemikalier, men god dispergering af testkemikaliet skal sikres. Ved hjælp af det anbefalede forhold mellem headspace og væskevolumen på 1:2 kan flygtige kemikalier med en Henrys konstant på op til 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ testes, da testkemikaliets andel af headspace ikke overstiger 1 % (13). Et mindre headspace-volumen kan anvendes ved test af kemikalier, der er mere flygtige, men hvis biotilgængelighed virker begrænsende, navnlig hvis de er tungtopløselige i vand. Brugerne skal dog sikre, at forholdet mellem headspace og væskevolumen og koncentrationen af testkemikaliet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig aerob bionedbrydning. Det skal f.eks. undgås at bruge en høj substratkoncentration og et lille headspace-volumen. Vejledning i dette findes i (13) (23).

REFERENCEKEMIKALIER

12. For at kontrollere testfremgangsmåden testes et referencekemikalie med kendt bionedbrydelighed parallelt. Til det formål kan anilin, natriumbenzoat eller ethylenglycol anvendes i forbindelse med test af vandopløselige testkemikalier og 1-octanol til tungtopløselige testkemikalier (13). Bionedbrydning af disse kemikalier skal nå op på > 60 % af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof inden for 14 dage.

REPRODUCERBARHED

13. I ISO-ringtesten af metoden (17) blev følgende resultater opnået under de anbefalede betingelser, herunder 20 mg C testkemikalie pr. liter.

Testkemikalie	Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Anilin	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Variabiliteten inden for testen (replikabilitet), ved brug af anilin, var lav, idet variationskoefficienterne var mindre end 5 % i næsten alle testserier. I de to tilfælde, hvor replikabiliteten var ringere, skyldtes den større variabilitet sandsynligvis en høj produktion af uorganisk kulstof i blindprøverne. Replikabiliteten var ringere med 1-octanol, men stadig mindre end 10 % for 79 % af testserierne. Denne større variabilitet inden for testen kan skyldes doseringsfejl, da en lille mængde (3-4 µl) 1-octanol skulle injiceres i lukkede testflasker. Der opnås højere variationskoefficienter, når der anvendes lavere koncentrationer af testkemikaliet, især ved koncentrationer under 10 mg C/l. Dette kan delvist afhjælpes ved at reducere koncentration af det totale kulstofindhold i inokulum.

▼**M4**

14. I en EU-ringtest (24) af fem overfladeaktive stoffer, som blev tilsat med 10 mg C/l, blev der opnået følgende resultater:

Testkemikalie	Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Tetrapropylen benzensulfonat	17	45	10
Di-isooctylsulfo-succinat (anionisk)	72	22	9
Hexadecyl-trimethyl- (*) ammoniumchlorid (kationisk)	75	13	10
Isononylphenol-(ethoxylat)$_9$ (nonionisk)	41	32	10
Coco-amid-propyl-dimethylhydroxy-sulfobetain (amfoter)	60	23	11

(*) SiO_2 blev tilsat for at neutralisere toksicitet.

I henhold til resultaterne var variabiliteten generelt højere for de mindre velnedbrudte overfladeaktive stoffer. Variabiliteten inden for testen var mindre end 15 % for over 90 % af tilfældene, og den højeste nåede op på 30-40 %.

BEMÆRK: De fleste overfladeaktive stoffer er ikke enkeltmolekyler, men er blandinger af isomerer, homologer osv., der nedbrydes efter forskellige karakteristiske lag-perioder og ved forskellige kinetiske hastigheder, så der fås »uklare« kurver, som betyder, at pass-værdien på 60 % måske ikke nås inden for 10-dages-vinduet, selv om hvert molekyle når op på > 60 % inden for 10 dage, hvis det testes alene. Dette kan også observeres i forbindelse med andre komplekse blandinger.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

15. Sædvanligt laboratorieudstyr og:

a) Glasserumflasker, lukket med propper af butylgummi og »crimp-on« aluminiumslåg. Den anbefalede størrelse er »125 ml«, som har et samlet volumen på ca. 160 ml. Volumen for hver flaske skal være angivet til 160 ± 1 ml. En mindre beholder kan bruges, hvis resultaterne opfylder betingelserne i afsnit 66 og 67.

b) Kulstofanalysator eller andet instrument (f.eks. gaskromatograf) til måling af uorganisk kulstof.

▼M4

c) Sprøjter med høj præcision til gasformige og flydende prøver.

d) Orbitalryster i temperaturreguleret miljø.

e) Tilførsel af CO_2-fri luft — dette kan fremstilles ved at lade luft passere gennem natriumhydroxidperler eller ved hjælp af en gasblanding af 80 % N_2/20 % 0_2 (valgfrit) (se afsnit 28).

f) Membranfiltreringsapparatur med porøsitet på 0,20-0,45 μm (valgfrit).

g) Organisk kulstofanalysator (valgfri).

Reagenser

16. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen.

Vand

17. Der anvendes destilleret eller deioniseret vand med ≤ 1 mg/l samlet organisk kulstof. Det repræsenterer ≤ 5 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført ved den anbefalede dosis af testkemikaliet.

Stamopløsninger til medium med mineralsalte

18. Stamopløsningerne og mediet af mineralsalte ligner dem, der anvendes i ISO 14593 (16) og testen for let bionedbrydelighed i kapitel C.4 i dette bilag (20). Der bør kun undtagelsesvis anvendes en højere koncentration af ammoniumchlorid (2,0 g/l i stedet for 0,5 g/l), f.eks. når koncentrationen af testkemikaliet er > 40 mg C/l. Stamopløsninger opbevares i køleskab og kasseres efter seks måneder eller tidligere, hvis der er tegn på udfældning eller mikrobiel vækst. Følgende stamopløsninger fremstilles:

a) Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatriumhydrogenfosfatdihydrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Ammoniumchlorid (NH_4Cl) 0,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Denne opløsnings pH skal være 7,4 (± 0,2). Hvis det ikke opnås, fremstilles en ny opløsning.

b) Calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

d) Jern(III)chloridhexahydrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Tilsæt en dråbe koncentreret HCl.

Fremstilling af mineralsk medium

19. 10 ml af opløsning a) blandes med ca. 800 ml vand (afsnit 17), og af opløsning b), c) og d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 liter med fortyndingsvand (afsnit 17).

Andre reagenser

20. Koncentreret orthophosphorsyre (H_3PO_4) (> 85 % masse pr. volumenenhed).

▼M4

7 M natriumhydroxidopløsning

21. 280 g natriumhydroxid (NaOH) opløses i 1 liter vand (afsnit 17). Bestem koncentrationen af opløst uorganisk kulstof (DIC) i denne opløsning, og anvend denne værdi ved beregningen af testresultatet (se afsnit 55 og 61), især på baggrund af validitetskriteriet i afsnit 66, litra b). Fremstil en frisk opløsning, hvis DIC-koncentrationen er for høj.

Testkemikalie

22. Fremstil en stamopløsning af et tilstrækkeligt vandopløseligt testkemikalie i vand (afsnit 17) eller i testmediet (afsnit 19) ved en koncentration, der helst er 100 gange højere end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen. Det kan være nødvendigt at justere stamopløsningens pH. Stamopløsningen tilsættes det mineralske medium for at opnå en endelig koncentration for organisk kulstof på 2-40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Hvis der anvendes lavere koncentrationer end disse, kan det påvirke den opnåede præcision. Opløselige og uopløselige flydende kemikalier kan tilsættes beholderne direkte ved hjælp af højpræcisionssprøjter. Lavt opløselige og uopløselige testkemikalier kan kræve særlig behandling (25). Der findes følgende valgmuligheder:

a) direkte tilsætning af kendte vejede mængder

b) ultralydsdispergering inden tilsætning

c) dispergering med hjælp fra emulgeringsmidler, hvor det dog fastlægges, om de har hæmmende eller stimulerende virkning på den mikrobielle aktivitet, inden tilsætning

d) adsorption af flydende testkemikalier eller en opløsning i et egnet flygtigt opløsningsmiddel til et inert medium eller underlag (f.eks. glasfiberfilter) efterfulgt af fordampning af det anvendte opløsningsmiddel og direkte tilsætning af kendte mængder

e) tilsætning af et kendt volumen af en opløsning af testkemikaliet i et meget flygtigt opløsningsmiddel til en tom testbeholder efterfulgt af fordampning af opløsningsmidlet.

Stoffer eller opløsningsmidler, der er anvendt i c), d) og e) skal testes for evt. stimulerende eller hæmmende virkning på den mikrobielle aktivitet (se afsnit 42, litra b)).

Referencekemikalie

23. Fremstil en stamopløsning af det opløselige referencekemikalie i vand (afsnit 17) ved en koncentration, der helst er 100 gange større end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen (20 mg C/l).

Test for hæmning

24. Testkemikalier udviser ofte ingen signifikant nedbrydning under de betingelser, der anvendes i forbindelse med vurderinger af let bionedbrydelighed. Det kan skyldes, at testkemikaliet har hæmmende virkning på inokulum ved den koncentration, som det anvendes med i testen. En test for hæmning kan indgå i testdesignet for at gøre det lettere (efterfølgende) at udpege hæmning som en mulig årsag eller medvirkende faktor. Alternativt kan testen for hæmning udelukke en sådan påvirkning og vise, at ingen eller kun let nedbrydning kan tilskrives manglende mulighed for mikrobielt angreb under de anvendte testbetingelser. For at få oplysninger om testkemikaliets toksicitet for (aerobe) mikroorganismer fremstilles en opløsning af testmediet, der indeholder testkemikaliet og referencekemikaliet (afsnit 19) ved de koncentrationer, som de er tilsat ved (se afsnit 22 og 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktiveret slam, spildevandsafløb (ikke-chlorerede), overfladevand og -jord eller en blanding af disse (20). Kildens biologiske nedbrydningsaktivitet skal kontrolleres ved hjælp af et referencekemikalie. Uanset kilden må mikroorganismer, der tidligere er eksponeret for testkemikaliet, ikke anvendes, hvis fremgangsmåden skal bruges som en test for let bionedbrydelighed.

Advarsel: Aktiveret slam, spildevand og spildevandsafløb kan indeholde patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

26. Erfaringer har vist, at det optimale volumen for inokulum er det volumen, som:

— er tilstrækkeligt til at skabe den nødvendige bionedbrydende aktivitet

— nedbryder referencekemikaliet med den angivne procentdel (se afsnit 66)

— giver 10^2 til 10^5 kolonidannende enheder pr. ml endelig blanding

— normalt giver en koncentration på 4 mg/l suspenderede stoffer i den endelige blanding, når aktiveret slam anvendes; koncentrationer på op til 30 mg/l kan anvendes, men kan forøge blindprøvernes CO_2-produktion markant (26)

— bidrager med under 10 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført af testkemikaliet

— generelt udgør 1-10 ml af inokulum til 1 liter testopløsning.

Aktiveret slam

27. Aktiveret slam udtages frisk fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjernes grove partikler ved sigtning (f.eks. ved hjælp af en sigte med et net på 1 mm^2), og slammet opbevares aerobisk indtil anvendelsen.

28. Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 × g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten kasseres. Slammet kan vaskes i den mineralske opløsning. Det koncentrerede slam suspenderes til en koncentration på 3-5 g suspenderede stoffer pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.

29. Slammet skal tages fra et velfungerende konventionelt rensningsanlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et rensningsanlæg, som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det resuspenderede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam resuspenderes i mineralsk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.

30. Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt resuspenderede slam eller af det ubehandlede slam med henblik på at bestemme mængden af suspenderede stoffer.

31. Et andet alternativ er at homogenisere aktiveret slam (3-5 g suspenderede stoffer pr. liter). Slammet behandles i en Waring-blender i 2 minutter ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i mindst 30 minutter, og væsken dekanteres fra til brug som inokulum i en mængde på 10 ml pr. liter mineralsk medium.

▼M4

32. Yderligere reduktion af den blinde CO_2-udvikling kan opnås ved at belufte slammet natten over med CO_2-fri luft. Brug 4 mg/l aktiverede slamfaststoffer som inokulumkoncentration i denne test (13).

Sekundært spildevand

33. Inokulum kan også fremstilles af sekundært udløb fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis det ikke er muligt, skal den prækonditioneres. Udløbet filtreres gennem et groft filter for at fjerne grove partikler, og pH-værdien måles.

34. For at reducere indholdet af uorganisk kulstof tilføres filtratet CO_2-fri luft (»såkaldt sparging«) (afsnit 15, litra e)), i 1 time, mens pH-værdien holdes på 6,5 ved hjælp af orthophosphorsyre (afsnit 20). pH-værdien genoprettes til den oprindelige værdi ved hjælp af natriumhydroxid (afsnit 21), og efter bundfældning i ca. 1 time udtages en passende mængde supernatant til inokulering. Denne »sparging« reducerer indholdet af uorganisk kulstof i inokulum. Når den anbefalede maksimumsmængde af filtreret »sparget« udløb (100 ml) pr. liter blev anvendt som inokulum, var mængden af uorganisk kulstof i blindkontrollerne i intervallet 0,4 til 1,3 mg/l (14), hvilket repræsenterede 2-6,5 % af testkemikaliet C ved 20 mg C/l og 4-13 % ved 10 mg C/l.

Overfladevand

35. En prøve udtages af egnet overfladevand. Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Prøven koncentreres om nødvendigt ved filtrering eller centrifugering. Den mængde inokulum, der skal anvendes i hver testbeholder, skal opfylde kriterierne i afsnit 26.

Jord

36. En prøve udtages af egnet jord i en dybde på op til 20 cm under jordoverfladen. Sten, planterester og hvirvelløse dyr fjernes fra jordprøven, inden den sigtes gennem et 2 mm net (hvis prøven er for våd til sigtning, lufttørres den inden sigtning). Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis prøven transporteres i en løst bundet sort plastpose, kan den opbevares i posen ved 2-4 °C i op til en måned).

Prækonditionering af inokulum

37. Inokulum kan prækonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnes til testkemikaliet. Prækonditionering kan reducere den blinde CO_2-udvikling. Prækonditioneringen består i beluftning af aktiveret slam efter fortynding i testmediet til 30 mg/l med fugtig CO_2-fri luft i op til 5-7 dage ved testtemperatur.

TESTPROCEDURE

Antal flasker

38. Det antal flasker (afsnit 15, litra a)), der skal bruges til en test, afhænger af analysehyppigheden og testvarigheden.

39. Det anbefales, at et tredobbelt antal flasker analyseres efter et tilstrækkeligt antal tidsintervaller, således at 10-dages-vinduet kan påvises. Mindst fem testflasker (afsnit 15, litra a)) fra sæt a), b) og c) (se afsnit 42) analyseres ved testens afslutning for at gøre det muligt at beregne 95 %-konfidensintervallet for den gennemsnitlige bionedbrydning i procent.

▼M4

Medium med inokulum

40. Inokulum bruges ved en koncentration på 4 mg/l aktiveret slam med faststoffer. Umiddelbart inden anvendelse fremstilles en tilstrækkelig mængde inokuleret medium ved f.eks. at tilsætte 2 ml korrekt behandlet aktiveret slam (afsnit 27-32) ved 2 000 mg/l til 1 liter medium med mineralsalte (afsnit 19). Når sekundært spildevandsudløb bruges, tilsættes op til 100 ml udløb (afsnit 33) til 900 ml medium med mineralsalte (afsnit 19), som fortyndes til 1 liter med medium.

Klargøring af flasker

41. Prøver af inokuleret medium dispenseres til replikatflasker, så der fås et forhold mellem headspace og væske på 1:2 (tilsæt f.eks. 107 ml til flasker med en kapacitet på 160 ml). Andre forhold kan anvendes, men se advarslen i afsnit 11. Uanset den anvendte type inokulum skal det sikres, at det inokulerede medium blandes tilstrækkeligt, så det fordeles ensartet til testflaskerne.

42. Sæt af flasker (afsnit 15, litra a)) klargøres til at indeholde følgende:

a) testbeholdere (benævnt som F_T), som indeholder testkemikaliet

b) blindkontroller (benævnt F_B), som kun indeholder testmediet plus inokulum; evt. kemikalier, opløsningsmidler, stoffer eller glasfiberfiltre, der anvendes til at tilsætte testkemikaliet til testbeholderen, skal også tilsættes

c) beholdere (benævnt F_C) med referencekemikaliet til at kontrollere fremgangsmåden

d) om nødvendigt beholdere (benævnt F_I) til at kontrollere, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie ved samme koncentration (afsnit 24) som i de andre flasker (henholdsvis F_T og F_C)

e) beholdere (benævnt F_S) til at kontrollere evt. abiotisk nedbrydning som a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ eller steriliseret på anden måde (f.eks. ved autoklavering).

43. Vandopløselige testkemikalier og referencekemikalier tilsættes som vandige stamopløsninger (afsnit 22, 23 og 24), så der fås en koncentration på 10 til 20 mg C/l.

44. Uopløselige testkemikalier og uopløselige referencekemikalier hældes på flasker på forskellige måder (se afsnit 22, litra a-e)) afhængigt af kemikaliets karakter enten før eller efter tilsætningen af mediet med inokulum og afhængigt af metoden til behandling af testkemikaliet. Hvis en af de fremgangsmåder, der er beskrevet i afsnit 22, litra a-e), anvendes, behandles blindkontrollerne F_B (afsnit 42, litra b)) på en lignende måde, men uden at tilsætte testkemikaliet eller referencekemikaliet.

45. Flygtige testkemikaliet injiceres i lukkede flasker (afsnit 47) ved brug af en mikrosprøjte. Dosis beregnes ud fra det injicerede volumen og testkemikaliets densitet.

46. Vand tilsættes beholdere efter behov for at opnå samme væskevolumen i hver beholder. Det skal sikres, at forholdet mellem headspace og væskevolumen (normalt 1:2) og koncentrationen af testkemikaliet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig bionedbrydning.

▼M4

47. Alle flasker lukkes derefter med f.eks. propper af butylgummi og aluminiumskapsler. Flygtige testkemikalier tilsættes på dette trin (afsnit 45). Hvis reduktionen i testopløsningens DOC-koncentration skal overvåges, og der skal udføres analyser fra nultid af den indledende koncentration af uorganisk kulstof (sterile kontroller, afsnit 42, litra e)) eller andre determinanter, udtages en passende prøve fra testbeholderen. Derefter kasseres testbeholderen med indhold.

48. De lukkede flasker anbringes på en orbitalryster (afsnit 15, litra d)), og der anvendes en rystehastighed, så flaskens indhold forbliver velblandet og suspenderet (f.eks. 150-200 rpm). Flaskernes inkuberes i mørke ved 20 °C (± 1 °C).

Prøvetagning

49. Prøvetagningsmønstret afhænger af lag-perioden og den kinetiske hastighed af testkemikaliets bionedbrydning. Flasker bruges til analyse på dagen for prøvetagning, som skal ske mindst ugentligt eller hyppigere (f.eks. to gange om ugen), hvis der kræves en fyldestgørende kurve for nedbrydning. Det krævede antal replikatflasker, herunder F_T, F_B og F_C samt evt. F_I og F_S (se afsnit 42), udtages fra rysteren. Testen forløber normalt over 28 dage. Hvis kurven for bionedbrydning indicerer, at der er opnået et plateau inden dag 28, kan testen afsluttes tidligere end efter 28 dage. Udtag prøver fra de fem flasker, der er reserveret til testens 28. dag, til analyse, og anvend resultaterne til at beregne konfidensintervallet eller variationskoefficienten for den procentvise bionedbrydning. Der skal ikke tages prøver af flasker, der anvendes til test for hæmning og abiotisk nedbrydning, så ofte som af de øvrige flasker. Dag 1 og dag 28 er nok.

Analyse af uorganisk kulstof

50. CO_2-produktionen i flasker bestemmes ved at måle stigningen i koncentrationen af uorganisk kulstof under inkubering. Der findes to anbefalede metoder til måling af den mængde uorganisk kulstof, der produceres i løbet af testen, og de er beskrevet nedenfor. Da metoderne kan give lidt forskellige resultater, bør den samme metode anvendes i hele testforløbet.

51. Metode a) anbefales, hvis mediet sandsynligvis indeholder rester af f.eks. glasfilterpapir og/eller uopløseligt testkemikalie. Denne analyse kan udføres ved hjælp af en gaskromatograf, hvis en kulstofanalysator ikke er til rådighed. Det er vigtigt, at flaskerne er ved eller tæt på testtemperaturen, når headspace-gassen analyseres. Metode b) kan være nemmere at anvende for laboratorier, der bruger en kulstofanalysator til at måle uorganisk kulstof. Det er vigtigt, at den natriumhydroxidopløsning (afsnit 21), der bruges til at omdanne CO_2 til karbonat, er friskfremstillet, eller at dens indhold af uorganisk kulstof er kendt, således at den kan tages i betragtning ved beregningen af testresultaterne (se afsnit 66, litra b)).

Metode a): forsuring til pH < 3

52. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof (f.eks. 1 % w/w CO_2 i N_2). Koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20) injiceres i låget på hver udtaget flaske for at reducere pH i mediet til < 3 (tilsæt f.eks. 1 ml til 107 ml testmedium). Flaskerne sættes tilbage på rysteren. Efter 1 times ryste ved testtemperaturen tages flaskerne af rysteren. Aliquoter (f.eks. 1 ml) af gas udtages fra headspace på hver flaske og overføres til kulstofanalysatoren. De målte koncentrationer af uorganisk kulstof registreres som mg C/l.

▼M4

53. Efter forsuring til pH < 3 og ækvilibrering ved 20 °C er ligevægtskonstanten for fordelingen af CO_2 mellem væske- og gasfasen i testflaskerne ved denne metode 1,0, når den måles som en koncentration (13). Dette påvises mindst én gang for et testsystem på følgende måde:

Klargør flasker med 5 og 10 mg/l som inaktivt kulstof ved hjælp af en opløsning af vandfrit natriumcarbonat (Na_2CO_3) i CO_2-frit vand klargjort ved forsuring af vand til pH 6,5 med koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20), sparging natten over med CO_2-fri luft og forøgelse af pH til neutralitet med alkali. Sørg for, at forholdet mellem headspace og væskevolumen er det samme som i testene (f.eks. 1:2). Foretag forsuring og ækvilibrering som beskrevet i afsnit 52, og mål koncentrationerne af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen. Kontroller, at de to koncentrationer er ens inden for margenen for forsøgsfejl. Hvis ikke, gennemgås fremgangsmåderne. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af fordelingen af uorganisk kulstof mellem væske- og gasfasen, hver gang testen udføres. Den bør udføres i forbindelse med kalibreringen.

54. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate (ikke-forsurede) flasker. De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

Metode b): omdannelse af CO_2 til karbonat

55. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof, f.eks. en opløsning af natriumbicarbonat ($NaHCO_3$) i CO_2-frit vand (se afsnit 53) i intervallet 0 til 20 mg/l som uorganisk kulstof. 7 M natriumhydroxidopløsning (afsnit 21) (f.eks. 1 ml til 107 ml medium) injiceres i låget på hver udtaget flaske, og flaskerne rystes i 1 time ved testtemperatur. Brug den samme NaOH-opløsning til alle flasker, der bruges på en bestemt dag, men ikke nødvendigvis til alle prøvetagninger i løbet af en test. Hvis der kræves absolutte blindværdier for uorganisk kulstof ved alle prøvetagninger, skal uorganisk kulstof i NaOH-opløsningen bestemmes, hver gang den anvendes. Flaskerne tages af rysteren og henstilles til bundfældning. Passende mængder (f.eks. 50 til 1 000 µl) af væskefasen i hver flaske udtages ved hjælp af en sprøjte. Prøverne overføres til kulstofanalysatoren, og koncentrationerne af uorganisk kulstof registreres. Det skal sikres, at analysatoren er udstyret til at håndtere alkaliske prøver, der er fremstillet ved hjælp af denne metode.

56. Efter tilsætning af alkali og omrysten er koncentrationen af uorganisk kulstof ved denne metode ubetydelig. For testsystemet bør dette kontrolleres mindst én gang ved hjælp af standarder for uorganisk kulstof, tilsætning af alkali og ækvilibrering samt måling af koncentrationen af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen (se afsnit 53). Koncentrationen i headspace skal være nær nul. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af næsten fuldstændig absorption af CO_2, hver gang testen udføres.

57. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate flasker (uden tilsat alkali). De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

Beregning af resultater

58. Hvis 100 % mineralisering af testkemikaliet til CO_2 antages, er den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThIC) ud over det, der produceres i blindkontrollerne, lig med det opløste organiske kulstof (TOC), der tilsættes hver flaske ved begyndelsen af testen, dvs.:

$$ThIC = TOC$$

Den samlede masse (mg) af uorganisk kulstof (TIC) i hver flaske er:

$$\begin{aligned} TIC &= (\text{mg C i væske} + \text{mg C i headspace}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{Ligning [1]}$$

hvor:

V_L = volumen af væske i flasken (liter)

C_L = koncentration af organisk kulstof i væske (mg/l som kulstof)

V_H = volumen af headspace (liter)

C_H = koncentration af organisk kulstof i headspace (mg/l som kulstof).

Beregningerne af TIC til de to analysemetoder, der anvendes til måling af uorganisk kulstof i denne test, er beskrevet nedenfor i afsnit 60 og 61. Den procentvise bionedbrydning (*%D*) fås i hvert tilfælde ved:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ligning [2]}$$

hvor:

TIC_t = mg TIC i testflaske på tidspunktet t

TIC_b = gennemsnitlig mg TIC i blindflasker på tidspunktet t

TOC = mg TOC indledningsvis tilsat testbeholderen.

Den procentvise bionedbrydning %D beregnes for testflasken (F_T), referenceflasken (F_C) og evt. flasken til kontrol for hæmning (F_I) ud fra de respektive mængder TIC, der er produceret indtil prøvetagningstidspunktet.

59. Hvis der er sket en signifikant stigning i TIC-indholdet i de sterile kontroller (F_S) i løbet af testperioden, kan det konkluderes, at der er sket abiotisk nedbrydning af testkemikaliet, og at dette skal tages i betragtning i beregningen af D i ligning [2].

Forsuring til pH < 3

60. Eftersom forsuring til pH < 3 og ækvilibrering fører til udligning af koncentrationen af TIC i væske- og gasfasen, skal kun koncentrationen af organisk kulstof måles i gasfasen. I henhold til ligning [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, hvor V_B = volumen i serumflaske.

Omdannelse af CO_2 til karbonat

61. I forbindelse med denne metode udføres beregningerne som i ligning [1], men den ubetydelige mængde af uorganisk kulstof i gasfasen ignoreres, dvs. $V_H \times C_H = 0$, og $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Angivelse af resultater

62. En bionedbrydningskurve fås ved at afsætte den procentvise bionedbrydning, D, i forhold til inkubationstiden. Hvis det er muligt, angives lag-fasen, bionedbrydningsfasen, 10-dages-vinduet og plateau-fasen, dvs. den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig. Hvis sammenlignelige resultater opnås for parallelle testflasker F_T (forskel på < 20 %), afsættes en gennemsnitlig kurve (se tillæg 2, figur 1); hvis ikke, afsættes kurver for hver flaske. Gennemsnitsværdien for den procentvise bionedbrydning i plateaufasen bestemmes, eller den højeste værdi vurderes (f.eks. når kurven falder i plateaufasen), men det er i sidstnævnte tilfælde vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi. Dette maksimale niveau af bionedbrydning angives som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliet« i testrapporten. Hvis antallet af testbeholdere var utilstrækkeligt til at indicere en plateaufase, anvendes de data, der er målt for den sidste testdag, til at beregne en gennemsnitlig værdi. Denne sidste værdi, gennemsnittet af fem replikater, bruges til at indicere den præcision, hvormed den procentvise bionedbrydning er bestemt. Endvidere rapporteres den værdi, der blev indhentet ved afslutningen af 10-dages-vinduet.

63. På samme måde afsættes der en kurve for referencekemikaliet, F_C, samt kontrollen for abiotisk eliminering, F_S, og kontrollen for hæmning, F_I, hvis de er medtaget.

64. De mængder af TIC, der er til stede i blindkontrollerne (F_B), registreres, og det samme gælder mængderne i F_S-flaskerne (abiotisk kontrol), hvis de er medtaget i testen.

65. Beregn D for F_I-flaskerne baseret på den teoretiske værdi for uorganisk kulstof, der fås fra blandingens referencekomponent alene. Hvis $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ % på dag 28, kan det antages, at testkemikaliet har hæmmet aktiviteten for inokulum, og at de lave værdier for D_{FT}, der blev opnået under testbetingelserne, kan tilskrives dette. I dette tilfælde gentages testen ved hjælp af en lavere testkoncentration og helst med reduktion af DIC i inokulum og TIC dannet i blindprøverne, da den lavere koncentration ellers vil reducere metodens præcision. Ellers kan der anvendes et andet inokulum. Hvis der i flasken F_S (abiotisk) observeres en signifikant stigning (> 10 %) i mængden af TIC, kan abiotiske nedbrydningsprocesser være opstået.

Resultaternes validitet

▼M7

66. En test anses for gyldig, hvis:

a) den gennemsnitlige procentvise nedbrydning i F_C-beholdere, som indeholder referencekemikaliet, er > 60 % på den 14. inkubationsdag, og

b) den gennemsnitlige mængde af TIC i blindkontrollerne F_B ved slutningen af testen er < 3 mg C/l.

Hvis disse grænser ikke overholdes, gentages testen med et inokulum fra en anden kilde, og/eller de anvendte fremgangsmåder kontrolleres. Hvis f.eks. en høj blindproduktion af uorganisk kulstof er et problem, følges fremgangsmåden i afsnit 27-32.

(1) Den procentvise nedbrydning i F_C-flasker med referencestoffet.
(2) Den procentvise nedbrydning i F_I-flasker.

▼M4

67. Hvis testkemikaliet ikke når op på 60 % ThIC, og det er påvist, at det ikke er hæmmende (afsnit 65), kan testen gentages med en højere inokulumkoncentration (op til 30 mg/l aktiveret slam og 100 ml udløb/l) eller inokulum fra andre kilder, navnlig hvis nedbrydning var i intervallet 20-60 %.

Fortolkning af resultater

68. Bionedbrydning > 60 % ThIC inden for 10-dages-vinduet i denne test viser, at testkemikaliet er let bionedbrydeligt under aerobe betingelser.

69. Hvis pass-værdien på 60 % ThIC ikke opnås, bestemmes pH-værdien i medier i flasker, der ikke er blevet forsuret eller alkaliske. En værdi på mindre end 6,5 kunne indicere, at nitrificering er forekommet. I det tilfælde gentages testen med en bufferopløsning med en højere koncentration.

Testrapport

70. Opstil en tabel over % D for hver testflaske (F_T), referenceflaske (F_C) og evt. flaske til kontrol for hæmning (F_I) for hver prøvetagningsdag. Hvis sammenlignelige resultater opnås for replikatflasker, afsættes en kurve over gennemsnitlig % D i forhold til tid. Registrer mængden af TIC i blindflasker (F_B) og i de sterile kontrolflasker (F_S) samt DOC og/eller andre determinanter og deres procentvise eliminering.

71. Bestem gennemsnitsværdien for % D i plateaufasen, eller anvend den højeste værdi, hvis kurven for bionedbrydning falder i plateaufasen, og rapporter dette som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliet«. I sidstnævnte tilfælde er det vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi.

72. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) af teststoffet.

Testbetingelser:

— reference til denne testmetode

— beskrivelse af det anvendte testsystem (f.eks. beholderens volumen, forhold mellem headspace og væske, omrøringsmetode osv.)

— tilførsel af testkemikaliet og referencekemikaliet til testsystemet: anvendt testkoncentration, mængde af kulstof tilsat hver testflaske og anvendte opløsningsmidler

— detaljer om det anvendte inokulum, evt. forbehandling og prækonditionering

— inkubationstemperatur

— validering af princippet for analyse af uorganisk kulstof

— primære karakteristika for den anvendte kulstofanalysator (og andre anvendte analysemetoder)

— antal replikater.

Resultater:

— rådata og beregnede værdier for bionedbrydelighed opstillet i tabelform

▼M4

— afbildning af den procentvise nedbrydning i forhold til tid for test- og referencekemikalier med angivelse af lag-periode, nedbrydningsfase, 10-dages-vindue og hældning

— procentvis eliminering ved plateau, ved testens afslutning og efter 10-dages-vinduet

— årsager til evt. afvisning af testresultaterne

— andre fakta, der er relevante for den anvendte fremgangsmåde

— diskussion af resultater.

LITTERATUR:

(1) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed — CO_2-udvikling (metode C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA og Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revideret 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I og Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM og Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH og Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL og Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J og Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR og Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, og Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR og Starkey M (1999). An »inherent« biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) og Final report (M. Kitano og M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ og Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, Det Forenede Kongerige.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Tillæg 1

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

IC: uorganisk kulstof.

$ThCO_2$: teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af testkemikaliets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af testkemikaliet; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg testkemikalie.

DOC: opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 μm filter eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 4 000 g (ca. 40 000 ms^{-2}) i 15 minutter.

DIC: opløst uorganisk kulstof.

ThIC: teoretisk uorganisk kulstof.

TIC: totalt uorganisk kulstof.

Let bionedbrydelig: en arbitrær klasse af kemikalier, der har bestået visse specifikke screeningstest for fuldstændig bionedbrydning; disse test er så krævende, at sådanne kemikalier i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

10-dages-vindue: den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

Iboende bionedbrydelighed: en klasse af kemikalier, som ved enhver bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

Endelig aerob bionedbrydning: den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et testkemikalie fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, mineralsalte og nye cellebestanddele (biomasse).

Mineralisering: fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til CO_2 og H_2O under aerobe betingelser, og til CH_4, CO_2 og H_2O under anaerobe betingelser.

Lag-fase: den tid, der går fra et forsøg begynder, indtil de nedbrydende mikroorganismer har tilpasset sig, og nedbrydningsgraden for et testkemikalie eller organisk materiale har nået et detekterbart omfang (f.eks. 10 % af den teoretiske maksimale bionedbrydning, evt. mindre, afhængigt af måleteknikkens nøjagtighed).

Nedbrydningsfase: tidsrummet mellem lag-periodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

Plateaufase: den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

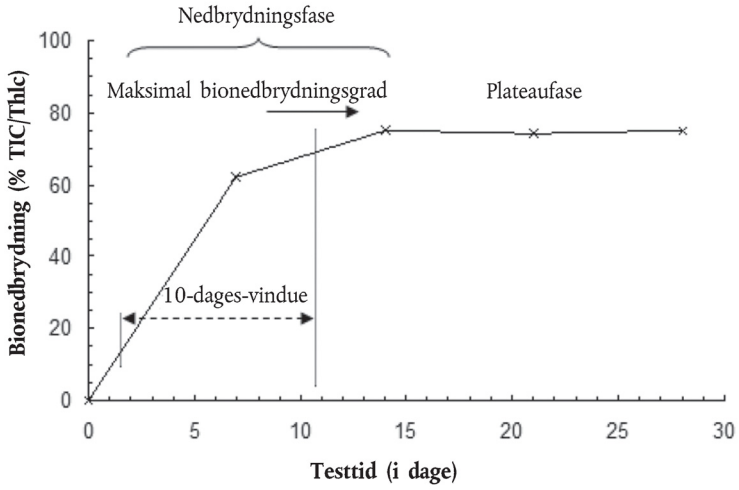
▼M4

Tillæg 2

Eksempel på kurve for bionedbrydning

Figur 1

Bionedbrydning af 1-octanol i test af CO_2 i headspace



Ordliste

Bionedbrydning

Nedbrydningsfase

Maksimal bionedbrydningsgrad

Plateaufase

10-dages-vindue

Testtid (i dage)

▼M4

C.30. BIOAKKUMULERING I TERRESTRISKE OLIGOCHAETER

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 317 (2010). Blandt testmetoderne vedrørende skæbne i miljøet blev Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk (kapitel C.13 i dette bilag (49)) og Bioakkumulering i bentiske oligochaeter, der lever i sediment (53), offentliggjort i henholdsvis 1996 og 2008. Ekstrapoleringen af data om akvatisk bioakkumulering til landorganismer, som f.eks. regnorm, er vanskelig, hvis overhovedet mulig. Modelberegninger baseret på et testkemikalies lipofile karakter, f.eks. (14) (37), anvendes i dag til at vurdere bioakkumulering af kemikalier i jord, som f.eks. EU's Technical Guidance Document (19). Behovet for en rumspecifik testmetode er allerede blevet imødekommet, f.eks. (55). En sådan metode er især vigtig for evalueringen af sekundær forgiftning i landbaserede fødekæder (4). Flere nationale testmetoder omhandler spørgsmålet om bioakkumulering i andre organismer end fisk, f.eks. (2) og (72). En metode vedrørende måling af bioakkumulering fra forurenet jord i regnorm (Eisenia fetida, Savigny) og kompostorm er udviklet af American Society for Testing and Materials (3). En internationalt anerkendt metode til bestemmelse af bioakkumulering i forurenet jord vil forbedre risikovurderingen af kemikalier i terrestriske økosystemer, f.eks. (25) (29).

2. Invertebrater, der lever af jord, eksponeres for jordbundne kemikalier. Blandt disse dyr spiller terrestriske oligochaeter en vigtig rolle for jordbundens struktur og funktion (15) (20). Terrestriske oligochaeter lever i jord og delvist på jordoverfladen (især i strølaget). De repræsenterer i mange tilfælde den mest rigelige art med hensyn til biomasse (54). Ved bioturbation af jorden og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af kemikalier for andre organismer, herunder invertebrater (såsom rovmider og biller; f.eks. (64)) eller vertebrate rovdyr (såsom ræve og måger) (18) (62). Nogle arter af terrestriske oligochaeter, som i øjeblikket anvendes i forbindelse med økotoksikologiske test, er beskrevet i tillæg 5.

3. ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus (3) indeholder mange vigtige og nyttige oplysninger om udførelsen af denne testmetode vedrørende bioakkumulering i jord. Yderligere dokumenter, der henvises til i denne testmetode, er kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk (49) og OECD TG 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates (53). Praktisk erfaring med forsøg vedrørende bioakkumulering i jord og publikationer, f.eks. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) og (79), er andre vigtige kilder til oplysninger i forbindelse med denne testmetode.

4. Denne testmetode gælder primært for stabile, neutrale organiske kemikalier, der ofte adsorberes til jord. Test for bioakkumulering af jordtilknyttede, stabile organiske metalforbindelser kan også udføres ved hjælp af denne testmetode. Den kan også anvendes i forbindelse med metaller og andre sporstoffer.

FORUDSÆTNINGER

5. Test, der har til formål at måle bioakkumuleringen af et kemikalie i terrestriske oligochaeter, er udført med tungmetaller (se f.eks. (63)) og persistente, organiske kemikalier med log K_{ow}-værdier mellem 3,0 og 6,0, f.eks. (40). Sådanne test kan også udføres i forbindelse med:

— kemikalier, der har en log K_{ow} på mere end 6,0 (super-hydrofobe kemikalier)

▼M4

— kemikalier, der tilhører en klasse af organiske kemikalier, der vides at have potentialet til at bioakkumuleres i levende organismer, f.eks. overfladeaktive kemikalier eller kemikalier med høj adsorptionsevne

— kemikalier, hvis strukturelle karakteristika indicerer et potentiale for bioakkumulering, f.eks. analoger til kemikalier med kendt bioakkumuleringspotentiale, og

— metaller.

6. Oplysninger om testkemikaliet, f.eks. generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed, sikkerhedsforanstaltninger, korrekt opbevaring og analysemetoder, indhentes, inden forsøget påbegyndes. Derudover skal følgende oplysninger foreligge:

a) opløselighed i vand

b) oktanol/vandfordelingskoefficient, K_{ow}

c) jord/vandfordelingskoefficient, K_{oc}

d) damptryk

e) nedbrydelighed (f.eks. i jord eller vand)

f) kendte metabolitter.

7. Der kan anvendes testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning. Af hensyn til analysen anbefales det dog at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Denne beslutning træffes ud fra detektionsgrænserne eller et krav om at måle et oprindeligt testkemikalie og metabolitter. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, og den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles, er det vigtigt, at det radioaktive restmateriale i både jorden og testorganismerne karakteriseres med hensyn til procentdele af oprindeligt testkemikalie og mærkede ikke-oprindelige kemikalier, f.eks. i prøver udtaget ved steady state eller ved slutningen af optagelsesfasen, således at en bioakkumuleringsfaktor (BAF) kan beregnes for det oprindelige testkemikalie og de undersøgte jordmetabolitter (se afsnit 50). Den metode, der beskrives her, skal evt. tilpasses, f.eks. for at opnå tilstrækkelig biomasse, ved måling af organiske testkemikalier eller metaller, der ikke er radioaktivt mærkede. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (ved hjælp af væskescintillationstælling efter ekstraktion, forbrænding eller opløsning af væv), baseres bioakkumuleringsfaktoren på det oprindelige testkemikalie og metabolitter. BAF-beregningen bør baseres på koncentrationen af det oprindelige testkemikalie i organismerne og den samlede mængde radioaktivt restmateriale. Efterfølgende beregnes biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF), normaliseret til fedtindholdet i orm og det organiske kulstofindhold i jord, ud fra BAF for at kunne sammenligne resultaterne mellem forskellige bioakkumuleringstest.

8. Testkemikaliets toksicitet for de arter, der anvendes i testen, skal være kendt, f.eks. en effektkoncentration (ECx) eller letal koncentration (LCx) på tidspunktet for optagelsesfasen (f.eks. (19)). Den valgte koncentration af testkemikaliet bør være ca. 1 % af den akutte asymptotiske LC_{50} og mindst 10 gange højere end detektionsgrænsen i jord ved den anvendte analysemetode. Der anvendes fortrinsvis toksicitetsværdier fra langvarige forsøg vedrørende subletale effektparametre (51) (52), hvis de foreligger. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige, vil en akut toksicitetstest give nyttige oplysninger (se f.eks. (23)).

▼M4

9. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og sensitivitet til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsninger, jord og biologisk materiale, oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares, samt sikkerhedsdatablade for materialer. Oplysninger om analytiske detektionsgrænser for testkemikaliet i jord og ormevæv skal også foreligge. Hvis der bruges et ^{14}C-mærket testkemikalie, skal den specifikke radioaktivitet (dvs. Bq mol-1) og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt. Testkemikaliets specifikke radioaktivitet skal være høj nok til at muliggøre analyse, og de anvendte testkoncentrationer må ikke fremkalde toksiske virkninger.

10. Testen kan udføres med syntetisk eller naturlig jord. Oplysninger om karakteristika for den anvendte naturlige jord, f.eks. jordens oprindelse eller bestanddele, pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og vandbindingsevne (WHC), skal foreligge, inden testen påbegyndes (3) (48).

TESTENS PRINCIP

11. De parametre, der karakteriserer bioakkumuleringen af et testkemikalie, omfatter bioakkumuleringsfaktoren (BAF), hastighedskonstanten for optagelse (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e). Definitioner findes i tillæg 1.

12. Testen omfatter to faser: optagelsesfasen (eksponering) og elimineringsfasen (efter-eksponering). I optagelsesfasen eksponeres replikate grupper af orm for jord, der er »spiked« (forurenet) med testkemikaliet. Ud over testorganismerne holdes grupper af kontrolorm under identiske betingelser, men uden testkemikaliet. Testorganismernes tørvægt og fedtindhold måles. Dette kan gøres ved hjælp af orm i kontrolgruppen. Analytiske baggrundsværdier (blinde) kan fås ved at analysere prøver af kontrolorm og jord. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Der kræves altid en elimineringsfase, medmindre optagelsen af testkemikaliet i eksponeringsfasen har været ubetydelig. En elimineringsfase giver oplysninger om den hastighed, hvormed testkemikaliet udskilles af testorganismerne (f.eks. (27)). Hvis der ikke opnås steady state i optagelsesfasen, baseres bestemmelsen af de kinetiske parametre — kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAFk), hastighedskonstanter for optagelse og eliminering — fortrinsvis på samtidig tilpasning af resultaterne af optagelses- og elimineringsfaserne. Koncentrationen af testkemikaliet i/på ormene overvåges i løbet af begge faser i testen.

13. I løbet af optagelsesfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i op til 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), indtil steady state er opnået (11) (12) (67). Steady state opnås, når en kurve over koncentrationen i orm i forhold til tid bliver parallel med tidsaksen, og tre på hinanden følgende koncentrationsanalyser af prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden baseret på statistiske sammenligninger (f.eks. variansanalyse og regressionsanalyse).

14. I elimineringsfasen overføres testorganismerne til beholdere med samme substrat, men uden testkemikaliet. I løbet af elimineringsfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre tidligere analytisk bestemmelse har påvist en reduktion af reststoffer af testkemikaliet i orm på 90 %. Koncentrationen af testkemikaliet i ormene ved slutningen af elimineringsfasen rapporteres

▼M4

som ikke-elimineredе reststoffer. Steady state-bioakkumuleringsfaktoren (BAFss) beregnes så vidt muligt både som forholdet mellem koncentrationen i orm (Ca) og i jorden (Cs) ved steady state og som en kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAFk), som forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord (ks) og hastighedskonstanten for eliminering (ke) (definitioner findes i tillæg 1), idet kinetikken antages at være af første orden (beregninger findes i tillæg 2). Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, anvendes andre modeller.

15. Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for eliminering (eller konstanterne, hvis andre modeller anvendes), den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAFk) og så vidt muligt konfidensgrænserne for hver af disse parametre beregnes ud fra computerbaserede modelligninger (se vejledning i tillæg 2). En models tilpasningsgrad kan bestemmes ud fra f.eks. korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter tæt på én indicerer god tilpasning), eller den kan beregnes ved hjælp af chi i anden. Størrelsen af standardfejl eller konfidensinterval omkring de estimerede parametre kan også indicere modellens tilpasningsgrad.

16. For at reducere variabiliteten i testresultater for stærkt lipofile testkemikalier udtrykkes bioakkumuleringsfaktorer i forhold til fedtindholdet og det organiske kulstofindhold (kg organisk kulstof i jord kg-fedt i 1 orm). Denne tilgang er baseret på den kendsgerning, at der for nogle kemiske stofgrupper er en tydelig sammenhæng mellem kemikaliernes bioakkumuleringspotentiale og deres lipofile karakter. Dette er veldokumenteret for fisk (47). Der er en sammenhæng mellem fiskenes fedtindhold og sådanne kemikaliers bioakkumulering. For bentiske organismer er der konstateret lignende korrelationer, f.eks. (30) (44). For terrestriske oligochaeter er denne korrelation også påvist, f.eks. (5) (6) (7) (14). Hvis tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, kan testorganismernes fedtindhold bestemmes på det samme biologiske materiale som det, der benyttes til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet. Alternativt kan fedtindholdet måles på kontroldyr.

TESTENS VALIDITET

17. Hvis en test skal være gyldig, skal følgende kriterier opfyldes af både kontroller og behandlingsprøver:

— Ved slutningen af testen må den samlede mortalitet i optagelses- og elimineringsfasen ikke overstige 10 % (regnorm) eller 20 % (enchytraeider) af det samlede antal tilførte orm.

— For Eisenia fetida og Eisenia andrei må det gennemsnitlige tab målt ved slutningen af optagelsesfasen og slutningen af elimineringsfasen ikke overstige 20 % sammenlignet med den indledende frisk vægt ved begyndelsen af hver fase.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forsøgsarter

18. Der anbefales flere arter af terrestriske oligochaeter til test af bioakkumulering. De oftest anvendte arter, Eisenia fetida eller Eisenia andrei (Lumbricidae), Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus eller Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae), er beskrevet i tillæg 5.

▼M4

Apparatur

19. Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, som kan opløses, adsorbere testkemikaliet eller afgive andre kemikalier og have en skadelig virkning på testorganismerne. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardbeholdere af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af forsøgsorm. Udstyr, der kommer i kontakt med testmedierne, kan være fremstillet af rustfrit stål, plast eller glas. Testbeholderne skal overdækkes for at forhindre, at ormene slipper ud, men der skal være tilstrækkelig luftforsyning. For kemikalier med høj adsorptionskoefficient, såsom syntetiske pyrethroider, kan det være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug (49). Udslip af radioaktivt mærkede testkemikalier og flygtige kemikalier skal forhindres. Udskillere (f.eks. gasvaskeflasker i glas) med egnede absorbenter anvendes til at tilbageholde reststoffer, der fordamper fra testbeholderne.

Jord

20. Testjord skal være af en sådan kvalitet, at testorganismerne kan overleve og helst forplante sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Ormene skal kunne grave sig ned i jorden.

21. Det anbefales at bruge den syntetiske jord, der er beskrevet i kapitel C.8 i dette bilag (48), som substrat i testene. Fremstilling af syntetisk jord til brug i bioakkumuleringstest og anbefalinger vedrørende opbevaring af syntetisk jord findes i tillæg 4. Lufttørret syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse.

22. Naturlig jord fra ikke-forurenede steder kan dog bruges som test- og/eller dyrkningsjord. Naturlig jord skal karakteriseres ved mindst oprindelse (opsamlingssted), pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og maksimal vandbindingsevne (WHCmax) samt vandindhold i procent (3). En analyse af jorden eller dens bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger. Hvis feltjord fra landbrugsarealer anvendes, må den ikke være blevet behandlet med plantebeskyttelsesmidler eller husdyrgødning fra behandlede dyr i mindst et år og med organisk gødning i mindst seks måneder inden prøvetagning (50). Fremgangsmåderne til håndtering af naturlig jord inden økotoksikologiske test med oligochaeter i laboratoriet er beskrevet i (3). Naturlig jord opbevares så kort tid i laboratoriet som muligt.

Applikation af testkemikaliet

23. Testkemikaliet indarbejdes i jorden. Testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber tages i betragtning. Et vandopløseligt testkemikalie opløses fuldstændigt i vand, inden det blandes med jorden. Den anbefalede spiking-procedure i forbindelse med testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, omfatter overfladebehandling af en eller flere af bestanddelene i den naturlige eller syntetiske jord med testkemikaliet. Kvartssand eller en del heraf kan f.eks. gennemblødes med en opløsning af testkemikaliet i et egnet organisk opløsningsmiddel, som derefter langsomt fordamper, indtil det er tørt. Den overfladebehandlede andel blandes derefter med den våde jord. Den vigtigste

▼M4

fordel ved denne fremgangsmåde er, at der ikke tilsættes opløsningsmidler til jorden. Når naturlig jord anvendes, kan testkemikaliet tilsættes ved at spike en lufttørret del af jorden som beskrevet ovenfor for syntetisk jord eller ved at røre testkemikaliet ind i den våde jord. Dette efterfølges af et fordampningstrin, hvis en opløselighedsfremmer er blevet anvendt. Generelt bør det undgås, at den våde jord kommer i kontakt med opløsningsmidler. Følgende bør tages i betragtning (3):

— Hvis et andet opløsningsmiddel end vand anvendes, skal det kunne blandes med vand og/eller fjernes (f.eks. ved fordampning), så kun testkemikaliet er tilbage i jorden.

— Hvis der anvendes en opløsningsmiddelkontrol, er der ikke brug for en negativ kontrol. Opløsningsmiddelkontrollen skal indeholde den højeste koncentration af det opløsningsmiddel, der er tilført jorden, og skal være fra samme batch, som det middel, der er anvendt i stamopløsningen. Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af testkemikaliet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af en egnet opløselighedsfremmer.

24. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, kan 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder blandes med testkemikaliet, f.eks. ved hjælp af en morter og støder, for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt med en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles i testbeholderne. Fremgangsmåden gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en kontrol med 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder.

25. Koncentrationen af testkemikaliet i jorden bestemmes efter spiking. Inden testorganismerne tilsættes, kontrolleres det, at testkemikaliet er ensartet fordelt i jorden. Den anvendte spiking-metode og begrundelsen for valget af den pågældende metode anføres i rapporten (24).

26. Der etableres ideelt ligevægt mellem jord- og porevandfasen, inden testorganismerne tilsættes. En periode på fire dage ved 20 °C anbefales. For mange organiske kemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan det tage flere dage eller måneder at opnå ægte ligevægt mellem adsorberede og opløste andele. Afhængigt af forsøgets formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan den spikede jord »ældes« i længere tid. Hvis det drejer sig om metaller, kan det f.eks. være tre uger ved 20 °C (22).

Dyrkning af testorganismer

27. Orm holdes fortrinsvis i permanente laboratoriesystemer. Vejledning om laboratoriedyrkningsmetoder findes i tillæg 5, for så vidt angår arterne Eisenia fetida, Eisenia andrei og Enchytraeid (se også (48) (51) (52)).

28. De orm, der anvendes i test, må ikke have synlige sygdomme, misdannelser eller parasitter.

UDFØRELSE AF TESTEN

29. Testorganismerne eksponeres for testkemikaliet i løbet af optagelsesfasen. Optagelsesfasen bør vare 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre det kan påvises, at steady state er indtrådt.

▼M4

30. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Den første prøve udtages 4-24 timer efter elimineringsfasens start. Eksempler på prøvetagningsplaner for en 21-dages optagelsesfase og en 21-dages elimineringsfase findes i tillæg 3.

Testorganismer

31. For mange arter af terrestriske enchytraeider er den individuelle vægt meget lav (f.eks. 5-10 mg vådvægt pr. individ for Enchytraeus albidus og mindre for Enchytraeus crypticus og Enchytraeus luxuriosus). For at kunne foretage vejningen og den kemiske analyse kan det være nødvendigt at samle ormene fra de replikate testbeholdere (dvs. alle orm i en replikat testbeholder bruges til at opnå et analyseresultat for væv). 20 individuelle enchytraeider tilsættes hver replikat, og der anvendes mindst tre replikater. Hvis den analytiske detektionsgrænse for testkemikaliet er meget høj, skal der muligvis bruges flere orm. For testarter med højere individuel vægt (Eisenia fetida og Eisenia andrei) kan der bruges replikate beholdere med ét individ.

32. De regnorm, der bruges i en test, bør være af ensartet vægt (Eisenia fetida og Eisenia andrei bør f.eks. have en individuel vægt på 250-600 mg). Enchytraeider (f.eks. Enchytraeus albidus) bør have en længde på ca. 1 cm. Alle orm i en bestemt test bør komme fra samme kilde og være voksne dyr med bælte (se tillæg 5). Da et dyrs vægt og alder kan have betydning for BAF-værdierne (f.eks. på grund af varierede fedtindhold og/eller tilstedeværelse af æg), registreres disse parametre nøjagtigt og under hensyntagen til fortolkningen af resultater. Desuden kan der i eksponeringsperioden være afsat kokoner, som også påvirker BAF-værdierne. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten (våd og tør) ved at veje en delprøve af testormene.

33. Der bør anvendes et højt jord-til-orm-forhold for at minimere reduktionen i koncentrationen af testkemikaliet i jorden i løbet af optagelsesfasen. Til Eisenia fetida og Eisenia andrei anbefales som minimum 50 g jord (tørvægt) pr. orm, og til enchytraeider anbefales som minimum 10-20 g jord (tørvægt) pr. testbeholder. Beholderne skal indeholde et jordlag på 2-3 cm (enchytraeider) eller 4-5 cm (regnorm).

34. De orm, der anvendes i en test, udtages fra dyrkningssystemet (f.eks. enchytraeider med pincet). Voksne dyr overføres fra ubehandlet testjord med henblik på akklimatisering og fodres (se afsnit 36). Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne, er en akklimatiseringsfase på 24-72 timer nok til at tilpasse ormene til testbetingelserne. Efter akklimatisering skylles ormene ved at overføre dem til glasplader (f.eks. petriglas) med rent vand. Efterfølgende vejes de, inden de tilsættes testjorden. Inden vejningen fjernes overskydende vand fra ormene ved forsigtigt at holde dem mod kanten af glaspladen eller duppe dem forsigtigt med et let fugtigt papirhåndklæde.

35. Testorganismernes nedgravningsadfærd observeres og registreres. I test med regnorm vil dyrene (kontrol og behandlingsprøver) normalt grave sig ned i jorden inden for en periode på få timer. Dette kontrolleres senest 24 timer efter tilsætning af ormene til testbeholderne. Hvis regnormene ikke graver

▼M4

sig ned (f.eks. mere end 10 % i løbet af mere end halvdelen af optagelsesfasen), indicerer det, at testbetingelserne ikke er hensigtsmæssige, eller at testorganismerne ikke er sunde. I det tilfælde afbrydes testen, hvorefter den gentages. Enchytraeider lever primært i de interstitielle porer i jorden, og deres integument er ofte kun i delvis kontakt med det omgivende substrat. Eksponering af gravende og ikke-gravende enchytraeider antages at være den samme, og en test skal ikke nødvendigvis gentages, selv om enchytraeider ikke graver sig ned.

Fodring

36. Fodring planlægges, hvis der anvendes jord med lavt samlet organisk kulstofindhold. Hvis der anvendes syntetisk jord, anbefales ugentlig fordring (dvs. ormene fodres én gang om ugen) bestående af 7 mg tørret møg pr. g jord (tørvægt) til regnorm, og en ugentlig fodring bestående af 2-2,5 mg malede havregryn pr. g jord (tørvægt) til enchytraeider (11). Den første foderration blandes i jorden umiddelbart inden tilsætningen af testorganismerne. Der anvendes fortrinsvis samme type foder som i dyrkningssystemet (se tillæg 5).

Lys og temperatur

37. Testene gennemføres under reguleret belysning med 16 timers lys og 8 timers mørke, helst 400-800 lux, i det område, hvor testbeholderne opbevares (3). Testtemperaturen skal være 20 ± 2 °C i hele testen.

Testkoncentrationer

38. Der anvendes én koncentration. Situationer, hvor yderligere koncentrationer kræves, skal begrundes. Hvis testkemikaliets toksicitet (ECx) ligger tæt på den analytiske detektionsgrænse, bør et radioaktivt mærket testkemikalie med høj specifik radioaktivitet anvendes. For metaller bør koncentrationen ligge over baggrundsniveauet i væv og jord.

Replikater

39. Til kinetiske målinger (optagelses- og elimineringsfasen) skal antallet af behandlede replikate beholdere som minimum være tre pr. prøvetagningstidspunkt. Der skal klargøres et tilstrækkeligt antal replikater til at dække alle prøvetagningstidspunkter i optagelses- og elimineringsfasen.

40. Til biologiske observationer og målinger (f.eks. forhold mellem tør- og vådvægt, fedtindhold osv.) og til analyse af baggrundskoncentrationer i orm og jord skal der bruges mindst 12 replikatbeholdere med en negativ kontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), hvis der ikke anvendes et andet opløsningsmiddel end vand. Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer til tilsætning af testkemikaliet, skal der tilvejebringes en opløsningsmiddelkontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), som indeholder alle bestanddele med undtagelse af testkemikaliet, ud over de behandlede replikater. I dette tilfælde kan der også klargøres fire yderligere replikate beholdere til en negativ kontrol (intet opløsningsmiddel) til evt. prøvetagning ved afslutningen af optagelsesfasen. Disse replikater kan derefter sammenlignes biologisk med opløsningsmiddelkontrollen for at få oplysninger om en mulig indvirkning af opløsningsmidlet på testorganismerne. Det anbefales, at der klargøres et tilstrækkeligt antal yderligere replikate reservebeholdere (f.eks. otte) til behandlingsprøver og kontrol.

▼M4

Hyppighed af målinger af jordkvaliteten

41. Jordens pH, jordens fugtindhold og temperaturen (kontinuerlig) i testrummet måles ved begyndelsen og slutningen af optagelses- og elimineringsfasen. En gang om ugen kontrolleres jordens fugtindhold ved at veje testbeholderne og sammenligne de faktiske vægte med de indledende vægte ved testens begyndelse. Vandtab kompenseres ved tilsætning af deioniseret vand.

Prøvetagning og analyse af orm og jord

42. Et eksempel på en tidsplan for optagelses- og elimineringsfasen i test af bioakkumulering i regnorm og enchytraeider findes i tillæg 3.

43. Der udtages prøver af jorden fra testbeholderne med henblik på bestemmelse af testkemikaliekoncentrationen, både inden ormene tilsættes og i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. I løbet af testen måles koncentrationerne af testkemikaliet i ormene og jorden. Generelt måles de samlede koncentrationer i jord. Koncentrationer i porevand kan også måles. I det tilfælde bør begrundelsen og metoderne fastlægges, inden forsøget indledes, og anføres i rapporten.

44. Der tages prøver af orm og jord mindst seks gange i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. Hvis stabiliteten af et testkemikalie påvises, kan antallet af jordanalyser reduceres. Der bør analyseres mindst tre replikater ved begyndelsen af afslutningen af optagelsesfasen. Hvis den koncentration i jord, der måles ved afslutningen af optagelsesfasen, afviger fra den indledende koncentration med mere end 30 %, analyseres jordprøver udtaget på de andre datoer også.

45. Udtag ormene fra jorden i en replikatbeholder på hvert prøvetagningstidspunkt (f.eks. efter at have spredt jorden i beholderen ud på en bakke og samlet ormene op med en pincet), skyl dem hurtigt med vand i et lavt glas eller på en stålbakke. Fjern overskydende vand (se afsnit 34). Overfør forsigtigt ormene til en allerede vejet beholder, og vej dem straks med tarmindhold.

46. Regnormene (Eisenia sp.) placeres derefter på f.eks. fugtigt filterpapir i en overdækket petriskål (se afsnit 34) natten over, så de kan tømme deres tarme. Efter udtømning bestemmes ormenes vægt, så en evt. reduktion i biomasse i løbet af testen kan vurderes (se validitetskriterierne i afsnit 17). Vejning og vævsanalyse af enchytraeider udføres uden tømning af tarme, da det er teknisk vanskeligt på grund af disse ormes lille størrelse. Straks efter den endelige fastlæggelse af vægten aflives ormene på den mest hensigtsmæssige måde (f.eks. ved hjælp af flydende nitrogen eller nedfrysning ved temperaturer under – 18 °C).

47. I løbet af elimineringsfasen udskifter ormene forurenet tarmindhold med ren jord. Det betyder, at målinger i ikke-udtømte orm (enchytraeider i denne sammenhæng), der udtages umiddelbart inden elimineringsfasen, omfatter forurenet tarmjord. For akvatiske oligochaeters vedkommende antages det, at størstedelen af det forurenede tarmindhold er blevet erstattet af rent sediment efter de første 4-24 timer af elimineringsfasen (se f.eks. (46)). Lignende resultater er rapporteret for regnorm i forsøg vedrørende akkumulering af radioaktivt mærket cadmium og zink (78). For så vidt angår ikke-udtømte enchytraeider, kan koncentration af denne første prøve i løbet af elimineringsfasen betragtes som koncentrationen i væv efter tarmtømning. For at tage højde for den uforurenede jords fortynding af testkemikaliekoncentrationen i løbet af elimineringsfasen kan vægten af tarmindholdet estimeres ud fra forholdet mellem ormenes vådvægt/ormenes askevægt eller ormenes tørvægt/ormenes askevægt.

▼M4

48. Jord- og ormeprøver bør analyseres umiddelbart efter udtagningen (dvs. inden for 1-2 dage), så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og elimineringshastigheder. Hvis analysen forsinkes, opbevares prøverne på en hensigtsmæssig måde, f.eks. ved dybfrysning (≤ – 18 °C).

49. Det kontrolleres, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af testkemikaliet i både jord og orm for den valgte metode. Ekstraktionsgraden, detektionsgrænsen (LOD) og kvantificeringsgrænsen (LOQ) rapporteres. Det kontrolleres ligeledes, at testkemikaliet ikke kan detekteres i kontrolbeholderne i højere koncentrationer end baggrundskoncentrationerne. Hvis koncentrationen af testkemikaliet i testorganismen Ca er > 0 i kontrolormene, medtages dette i beregningen af de kinetiske parametre (se tillæg 2). Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. som følge af adsorption af testkemikaliet til prøvetagningsudstyret) minimeres.

50. Når der anvendes radioaktivt mærkede testkemikalier, kan det oprindelige testkemikalie og metabolitter analyseres. Kvantificering af det oprindelige testkemikalie og metabolitter ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen giver vigtige oplysninger. Prøverne »oprenses« derefter, så det oprindelige testkemikalie kan kvantificeres separat. Hvis individuelle metabolitter overstiger 10 % af den samlede radioaktivitet i de analyserede prøver, bør disse metabolitter identificeres.

51. Den samlede genfinding og genfindingen af testkemikalie i orm, jord og evt. udskillere, der indeholder absorbenter for at fastholde fordampet testkemikalie, registreres og rapporteres.

52. Individer udtaget fra en testbeholder kan samles i en pool, hvis det drejer sig om enchytraeider, som er mindre end regnorm. Hvis denne »pooling« reducerer antallet af replikater, indskrænkes mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis der kræves en bestemt statistisk metode og styrke, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange replikate testbeholdere til, at den ønskede pooling, metode og styrke tilgodeses.

53. BAF bør udtrykkes både som funktion af samlet tørvægt og som funktion af fedtindholdet, hvis det kræves (f.eks. for meget hydrofobe kemikalier). Fedtindholdet bestemmes ved hjælp af egnede metoder. Eksisterende metoder, f.eks. (31) og (58), tilpasses til dette formål. Disse metoder anvender ekstraktion med chloroform/methanol. For at undgå brugen af chlorerede opløsningsmidler bør der anvendes en tilpasning af Bligh og Dyer-metoden (9) som beskrevet i (17). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier, er det vigtigt at give nærmere oplysninger om den anvendte metode. Når det er muligt, dvs. når tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, skal lipidanalysen foretages på samme prøve eller ekstrakt som det, der blev anvendt til analyse for testkemikaliet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi (49). Alternativt kan fedtindholdet måles på kontroldyr og derefter anvendes til at normalisere BAF-værdier. Sidstnævnte tilgang reducerer forureningen af udstyr med testkemikaliet.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

54. Testkemikaliets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på ormene i løbet af optagelsesfasen i forhold til tiden (lineære akser). Når kurven når et plateau, eller steady state (se definitioner i tillæg 1), beregnes steady state-bioakkumuleringsfaktoren BAFss ved hjælp af:

$$\frac{C_a \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}{C_s \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}$$

C_a er koncentrationen af testkemikalie i testorganisme

C_s er koncentrationen af testkemikalie i jord

55. Hvis steady state ikke nås, bestemmes BAFk, baseret på hastighedskonstanter, i stedet for BAFss, som beskrevet nedenfor:

— Bestem akkumuleringsfaktoren (BAF_K) som forholdet k_s/k_e.

— Optagelses- og elimineringshastigheder beregnes helst samtidig (se ligning 11 i tillæg 2).

— Hastighedskonstanten for eliminering (k_e) bestemmes normalt ud fra elimineringskurven (dvs. en afbildning af koncentrationen af testkemikaliet i ormene i løbet af elimineringsfasen). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse (k_s) på grundlag af k_e og en værdi af C_a, som udledes af optagelseskurven (disse metoder er også beskrevet i tillæg 2). Til at finde BAF_K og hastighedskonstanterne, k_s og k_e foretrækkes computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder. Hvis det er åbenbart, at elimineringen ikke er af første orden, anvendes andre modeller.

Testrapport

56. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliets akutte toksicitet eller langtidstoksicitet (f.eks. EC_x, LC_x og NOEC) over for terrestriske oligochaeter

— renhed, fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. log K_{ow} og vandopløselighed

— kemisk identifikation; testkemikaliets herkomst, identitet og koncentration af evt. opløsningsmiddel

— hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes: den præcise position af de mærkede atomer, den specifikke radioaktivitet og den radiokemiske renhed.

Testart:

— videnskabeligt navn, stamme, herkomst, evt. forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse osv.

▼M4

Testbetingelser:

— anvendt testfremgangsmåde

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testdesign (f.eks. testbeholdernes antal og størrelse, jordmasse og højde af jordlag, antal replikater, antal orm pr. replikat, antal testkoncentrationer, varighed af optagelses- og elimineringsfaser samt prøvetagningshyppighed)

— begrundelse for valget af testbeholdermateriale

— metode til klargøring og applikation af testkemikalie samt begrundelse for valg af specifik metode

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, der er benyttet til at bestemme disse værdier

— oprindelsen af bestanddele i syntetisk jord eller — hvis naturlige medier er anvendt — oprindelsen af jorden, beskrivelse af evt. forbehandling, resultater af kontroller (overlevelse, biomasseudvikling og reproduktion), jordkarakteristika (pH, samlet organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), WHC_{max}, vandindhold i procent ved testens start og afslutning og evt. andre målinger)

— detaljerede oplysninger om, hvordan jord- og ormeprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for testkemikalie i orm og jord og fedtindhold (hvis bestemt) samt genfinding af testkemikaliet.

Resultater:

— mortalitet for kontrolorm og orm i hver testbeholder samt evt. iagttaget unormal adfærd (f.eks. undvigelse af jord eller manglende reproduktion i bioakkumuleringstest med enchytraeider)

— forholdet mellem tørvægt og vådvægt for jord og testorganismer (anvendes til normalisering)

— ormenes vådvægt på hvert prøvetagningstidspunkt; for regnorm også vådvægten ved begyndelsen af testen og på hvert prøvetagningstidspunkt før og efter udtømning af tarme

— testorganismernes fedtindhold (hvis bestemt)

— kurver, der viser optagelses- og elimineringskinetikken for testkemikaliet i ormene samt tiden til steady state

— C_a og C_s (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) på alle prøvetagningstidspunkter (C_a udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af legemsvægt, C_s udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af jord). Hvis en biota-jord-akkumuleringsfaktor (BSAF) kræves (f.eks. til sammenligning af resultaterne fra to eller flere test udført med dyr med forskelligt fedtindhold), kan C_a også udtrykkes som g kg^{-1} fedtindhold i organismen, og C_s kan udtrykkes som g kg^{-1} organisk kulstofindhold i jorden

— BAF (udtrykt i kg jord·kg^{-1} orm), hastighedskonstant for optagelse fra jord k_s (udtrykt i g jord kg^{-1} orm dag^{-1}) og hastighedskonstant for elimination k_e (udtrykt i dag^{-1}); BSAF (udtrykt i kg jord organisk kulstofindhold kg^{-1} orm fedtindhold) kan også rapporteres

▼M4

— hvis målt: procentdele af oprindeligt kemikalie, metabolitter og bundne reststoffer, dvs. den procentdel af testkemikalie, der ikke kan ekstraheres med almindelige ekstraktionsmetoder, detekteret i jord og testorganismer

— metoder, der er anvendt til statistisk analyse af data.

Evaluering af resultater:

— resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i afsnit 17

— uventede eller usædvanlige resultater, f.eks. ufuldstændig eliminering af testkemikaliet fra testorganismerne.

LITTERATUR:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 s.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. I Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG og Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 s.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM og Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW og Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, I: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Nederlandene, s. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF, EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

(20) Edwards CA og Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 s.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th og Römbke J (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 s. Findes på: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 s.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 s.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW og Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K og Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). »*Eisenia foetida*« is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 s.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, I: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(49) Kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk.

(50) Kapitel C.21 i dette bilag, Jordmikroorganismer: Kvælstofomdannelsestest.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H og Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. I: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 s.

(60) Römbke J og Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J og Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R og Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93-100.

▼M4

(66) Sims R W og Gerard BM (1985). Earthworms, I: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.

(68) Spacie A og Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. I: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation — Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marts 2000.

(73) Van Brummelen TC og Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, I: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA og Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM og Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B og Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Tillæg 1

DEFINITIONER

Bioakkumulering: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium. Bioakkumulering er resultatet af både biokoncentrerings- og biomagnifikationsprocesser (se nedenfor).

Biokoncentration: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme som følge af optagelsen af kemikaliet alene fra det omgivende medium (dvs. via legemsflade og fordøjet jord) i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium.

Biomagnifikation: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme primært som følge af optagelsen af forurenet foder eller bytte i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i foder eller bytte. Biomagnifikation kan medføre overførsel eller akkumulering af testkemikaliet i fødekæder.

Eliminering af testkemikalie: tabet af kemikaliet fra testorganismens væv ved aktive eller passive processer, der forekommer uafhængigt af tilstedeværelsen eller fraværet af testkemikaliet i det omgivende medium.

Bioakkumuleringsfaktoren (BAF) på ethvert tidspunkt i denne bioakkumuleringstests optagelsesfase: koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen (C_a i $g \cdot kg^{-1}$ tørvægt orm) divideret med koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium (C_s som $g \cdot kg^{-1}$ tørvægt jord); BAF angives i enheder af kg jord·kg^{-1} orm.

Steady state-bioakkumuleringsfaktor (BAF_{ss}): er BAF ved steady state og ændres ikke signifikant over en længere periode, idet koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium (C_s som $g.kg^{-1}$ tørvægt jord) er konstant i denne tidsperiode.

Bioakkumuleringsfaktorer beregnet direkte ud fra forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord og hastighedskonstanten for eliminering (k_s og k_e, se nedenfor) betegnes kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAF_K).

Biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF): den fedtindholdsnormaliserede koncentration af testkemikaliet i eller på testorganismen divideret med den organisk kulstofnormaliserede koncentration af testkemikaliet i jorden ved steady state. C_a udtrykkes da som $g \cdot kg^{-1}$ fedtindhold i organismen, og C_s som $g \cdot kg^{-1}$ organisk indhold i jorden; BSAF angives i enheder af kg organisk kulstof·kg^{-1} fedt.

Plateau eller **steady state**: ligevægten mellem de optagelses- og elimineringsprocesser, der forekommer samtidig i løbet af eksponeringsfasen. Man taler om steady state i afbildningen af BAF i forhold til tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af BAF i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder. For testkemikalier, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende (49).

Organisk kulstof/vandfordelingskoefficient (K_{oc}): forholdet mellem et kemikalies koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i jord og kemikaliets koncentration i vand ved ligevægt.

Octanol-vandfordelingskoefficient (K_{ow}): forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt, også betegnet P_{ow}. Logaritmen til K_{ow} (log K_{ow}) benyttes som rettesnor for et kemikalies potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

▼**M4**

Optagelses- eller eksponeringsfasen: det tidsrum, hvori testorganismerne udsættes for testkemikaliet.

Hastighedskonstanten for optagelse fra jord (k_s): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den forøgelse af koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen, der følger af fasen for optagelse fra jord. k_s udtrykkes i g jord kg^{-1} orm d^{-1}.

Elimineringsfasen: tidsrummet efter overførsel af testorganismerne fra et forurenet medium til et medium uden testkemikaliet, hvor elimineringen (eller nettotabet) af kemikaliet fra testorganismerne undersøges.

Hastighedskonstanten for eliminering (k_e): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den reduktion af koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen, efter at testorganismerne er overført fra et medium med testkemikaliet til et medium uden dette stof; k_e udtrykkes i d^{-1}.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

Tillæg 2

Beregning af parametre for optagelse og eliminering

Den primære effektparameter i en bioakkumuleringstest er bioakkumuleringsfaktoren, BAF. Den målte BAF beregnes ved at dividere koncentration i testorganismen, C_a, med koncentrationen i jord, C_s, ved steady state. Hvis steady state ikke nås i optagelsesfasen, beregnes BAF_K ud fra hastighedskonstanter i stedet for BAFss. Det skal angives, om BAF er baseret på steady state-koncentrationer.

Den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_K), hastighedskonstanten for optagelse fra jord (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e) fås sædvanligvis ved at bruge computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder, f.eks. baseret på de modeller, der er beskrevet i (68). Ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og modelligningerne:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^t) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 1]}$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^t) \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 2]}$$

hvor:

C_a = koncentration af kemikalie i orm [g kg-1 våd- eller tørvægt]

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg-1 orm d-1]

C_s = koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d-1]

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen

beregner disse computerprogrammer værdier for BAF_K, k_s og k_e.

Når baggrundskoncentration i ikke-eksponerede orm, f.eks. på dag 0, adskiller sig signifikant fra nul (det kan f.eks. være tilfældet for metaller), skal denne baggrundskoncentration ($C_{a,0}$) medtages i ligningerne, så de lyder:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^t) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 3]}$$

og

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^t) \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 4]}$$

Hvis der observeres et signifikant fald i koncentrationen af testkemikaliet i jord i løbet af optagelsesfasen, kan følgende model anvendes, f.eks. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k0^t}) \qquad \text{[ligning 5]}$$

▼M4

hvor:

C_s = koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

k_0 = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d-1]

C_0 = indledende koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 7]}$$

hvor:

C_a = koncentration af kemikalie i orm [g kg-1 våd- eller tørvægt]

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg-1 orm d-1]

k_0 = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d-1]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d-1]

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen.

Når steady state opnås i løbet af optagelsesfasen (dvs. $t = \infty$), kan ligning 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 1]}$$

reduceres til:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ligning 8]}$$

I så fald er k_s/k_e x C_s en tilgang til koncentrationen af testkemikaliet i ormevæv ved steady state ($C_{a,ss}$).

Biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF) beregnes på følgende måde:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ligning 9]}$$

hvor f_{oc} er andelen af organisk kulstof i jord, f_{lip} er andelen af fedtindhold i orm, som begge fortrinsvis bestemmes på prøver udtaget fra testen og baseret på henholdsvis tørvægt eller vådvægt.

Elimineringskinetikken kan modelleres ved hjælp af data fra elimineringsfasen og ved anvendelse af følgende modelligning og en computerbaseret ikke-lineær parameterestimeringsmetode. Hvis de datapunkter, der er afsat i forhold til tid, indicerer et konstant eksponentielt fald i koncentrationen af testkemikaliet i testorganismerne, kan en etrumsmodel (ligning 9) bruges til at beskrive tidsforløbet for eliminering.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ligning 10]}$$

▼**M4**

Elimineringsprocesser kan være tofasede og udvise et hurtigt fald i C_a i begyndelsen, som ændres til et langsommere tab af testkemikalie i slutningen af elimineringsfasen, f.eks. (27) (68). De to faser kan fortolkes ud fra den antagelse, at der er to forskellige rum i organismen, hvorfra testkemikalie går tabt med forskellige hastigheder. I sådanne tilfælde henvises til specifik litteratur, f.eks. (38) (39) (40) (78).

Ved hjælp af modelligningerne ovenfor kan de kinetiske parametre (k_s og k_e) også beregnes i ét trin ved at anvende modellen for førsteordenskinetik på alle data fra både optagelses- og elimineringsfasen samtidig. En beskrivelse af en metode, der understøtter en sådan kombineret beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering, findes i (41) (73) og (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[ligning 11]}$$

Bemærk: Når optagelses- og elimineringsparametre estimeres samtidig fra de kombinerede optagelses- og elimineringsdata, er »m« som vist i ligning 11 en deskriptor, der sætter computerprogrammet i stand til at tildele ligningens underled til datasættene for den enkelte fase og udføre evalueringen korrekt (m = 1 for optagelsesfasen; m = 2 for elimineringsfasen).

Disse modelligninger skal dog bruges med forsigtighed, især når testkemikaliets biotilgængelighed eller (bio)nedbrydning ændres i løbet af testen (se f.eks. (79)).

▼M4

Tillæg 3

EKSEMPLER PÅ TIDSPLANER FOR BIOAKKUMULERINGSTEST

Test med regnorm

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrering ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal).
– 3 til – 1	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele.
0	Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delprøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
8 til 9	Samme som dag 3.
10	Samme som dag 1.
11 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
15 til 16	Samme som dag 3.
17	Samme som dag 1.
18 til 20	Samme som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
21	Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliets egenskaber.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

b) Elimineringsfase

Dag	Aktivitet
– 6	Fremstilling og befugtning af jordbestanddele. Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Inkubation ved testbetingelser i fire dage.
0 (afslutning af optagelsesfase)	Måling af temperatur og pH i jord. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Tilsætning af foderration. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord. Udtagning af jord- og ormeprøver efter 4-6 timer med henblik på bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
8 til 9	Samme som dag 3.
10	Samme som dag 1.
11 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
15 til 16	Samme som dag 3.
17	Samme som dag 1.

▼M4

Dag	Aktivitet
18 til 20	Samme som dag 3.
21	Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Inden starten på elimineringsfasen skal jord fremstilles på samme måde som inden optagelsesfasen.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

Test med enchytraeider

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrering ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal).
– 3 til – 1	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele.
0	Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delprøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af teststof.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
9	Samme som dag 1.
10	Samme som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
11	Samme som dag 1.
12 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliets egenskaber.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

▼M4

Tillæg 4

Syntentisk jord — anbefalinger vedrørende fremstilling og opbevaring

Da naturlig jord fra en bestemt kilde ikke er tilgængelig hele året, og da hjemmehørende organismer og tilstedeværelsen af mikroforurenere kan påvirke testen, anbefales det at bruge et syntetisk substrat, den syntetiske jord i henhold til kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme (48), i denne test. Flere forsøgsarter kan overleve, vokse og forplante sig i denne jord, og der opnås maksimal standardisering samt sammenlignelighed af test- og dyrkningsbetingelser inden for og mellem laboratorier.

Jordbestanddele

Tørv:	10 %	Sphagnumtørv i overensstemmelse med OECD Guideline 207 no. (48)
Kvartssand:	70 %	Industrielt kvartssand (lufttørret); kornstørrelse: over 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm, men alle partikler skal være ≤ 2 mm
Kaolinholdigt ler:	20 %	Kaolinindhold ≥ 30 %
Calciumcarbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent

Det organiske kulstofindhold i den syntetiske jord kan evt. reduceres, f.eks. ved at reducere indholdet af tørv til 4-5 % af tørjorden og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliet adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for ormene forøges (74). Det er blevet påvist, at Enchytraeus albidus og Eisenia fetida kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold, f.eks. 2,7 % (33) (61), og erfaringer viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv.

Fremstilling

De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratoriemixer). Dette gøres ca. en uge, inden testen påbegyndes. De blandede tørre jordbestanddele fugtes med deioniseret vand mindst 48 timer inden tilsætning af testkemikaliet for at ækvilibrere/stabilisere surheden. Til bestemmelse af pH-værdien anvendes en blanding af jord og 1 M KCl-opløsning i forholdet 1:5. Hvis pH-værdien ikke er inden for det krævede interval (6,0 ± 0,5), tilsættes en passende mængde $CaCO_3$ til jorden, eller en ny batch jord fremstilles.

Den maksimale vandbindingsevne (WHC) for den syntetiske jord bestemmes i overensstemmelse med ISO 11268-2 (35). Mindst to dage inden påbegyndelsen af testen fugtes den tørre syntetiske jord ved at tilsætte så meget deioniseret eller rekonstitueret vand, at ca. halvdelen af det endelige vandindhold opnås. Det endelige vandindhold skal være 40-60 % af den maksimale WHC. Når testen påbegyndes, fordeles den fugtede jord i så mange batches som det anvendte antal testkoncentrationer og kontroller, og fugtindholdet justeres til 40-60 % af WHC_{max} ved hjælp af en opløsning af testkemikaliet og/eller ved at tilsætte deioniseret eller rekonstitueret vand. Fugtindholdet bestemmes ved begyndelsen og slutningen af testen (ved 105 °C). Det skal være optimalt i forhold til artens behov. Fugtindholdet kan også kontrolleres på følgende måde: Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene.

▼M4

Opbevaring

De tørre bestanddele i syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse. Den fremstillede og fugtede jord kan opbevares køligt i op til tre dage inden spiking. Fordampningen af vand skal minimeres. Jord, der er tilsat testkemikaliet, anvendes straks, medmindre information indicerer, at den pågældende jord kan opbevares, uden at det påvirker testkemikaliets toksicitet og biotilgængelighed. Prøver af spiked jord opbevares i det tilfælde under de betingelser, der anbefales for det pågældende testkemikalie, indtil analyse.

▼M4

Tillæg 5

Arter af terrestriske oligochaeter, der anbefales til test af bioakkumulering fra jord

Regnorm

Den anbefalede testart er Eisenia fetida (Savigny 1826), som tilhører familien Lumbricidae. Siden 1972 har den været opdelt i to underarter (Eisenia fetida og Eisenia andrei (10)). I henhold til Jaenike (36) er de ægte særskilte arter. Eisenia fetida er letgenkendelig på sine lyse, gule striber mellem leddene, mens Eisenia andrei er ensartet mørkerød. De stammer sandsynligvis oprindeligt fra området omkring Sortehavet, men findes i dag i hele verden, især i menneskeskabte levesteder, som f.eks. kompostbunker. Begge kan bruges til økotoksikologiske test og bioakkumuleringstest.

Eisenia fetida og Eisenia andrei kan fås i handelen, f.eks. som fiskemadding. Sammenlignet med andre lumbricidregnorme har de en kort livscyklus på ca. 2-3 måneder (ved rumtemperatur). Deres optimale temperatur er ca. 20-24 °C. De foretrækker relativt fugtige substrater med næsten neutral pH og et højt indhold af organisk materiale. Da disse arter har været anvendt bredt i standardiserede økotoksikologiske test i omkring 25 år, er deres dyrkning veletableret (48) (77).

Begge arter kan opdrættes i forskellige dyreekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales af ISO (35) en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Mediet skal have en pH-værdi på ca. 6-7 (justeret med calciumcarbonat) og en lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration), og det må ikke være uforholdsmæssigt forurenet med ammoniak eller dyreurin. Kommerciel havejord fri for additiver eller syntetisk jord i henhold til OECD (48) eller en lige blanding af de to kan anvendes. Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Avlekasser med et rumfang på 10-50 l er passende.

For at få orm af standardalder og -masse er det bedst at starte dyrkningen med kokoner. Voksne orm sættes derfor i en avlekasse, der indeholder frisk substrat, med henblik på producere kokoner. Praktiske erfaringer har vist, at en populationstæthed på ca. 100 voksne orm pr. kg substrat (vådvægt) giver god reproduktion. Efter 28 dage fjernes de voksne orm. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne efter mindst to måneder, men højst efter 12 måneder.

Orm af de arter, der er beskrevet ovenfor, betragtes som sunde, hvis de bevæger sig gennem substratet, ikke forsøger at forlade substratet og formerer sig løbende. Meget langsom bevægelse eller gul bagende (i Eisenia fetidas tilfælde) indicerer udtømmelse af substrat. I det tilfælde bør der gives frisk substrat, og/eller antallet af orm pr. beholder bør reduceres.

Yderligere udvalgte referencer

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egele, P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R W og Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London, 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. I: Earthworm Ecology — from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 s.

Enchytraeider

Den anbefalede testart er Enchytraeus albidus Henle 1837 (hvid kompostorm). Enchytraeus albidus er en af de største (op til 15 mm) arter af Enchytraeidae-slægten af Oligochaeter (annelida), og den findes i hele verden, f.eks. (8). Enchytraeus albidus findes på marine, limniske og terrestriske levesteder, primært i organiske materialer under nedbrydning (tang og kompost) og sjældent i engområder (42). Den brede økologiske tolerance og visse morfologiske variationer indicerer, at arten omfatter forskellige racer.

Enchytraeus albidus sælges som fiskefoder. Det bør undersøges, om bestanden er kontamineret af andre, normalt mindre arter (60). Hvis kontaminering forekommer, bør alle orm skylles med vand i en petriskål. Store voksne individer af Enchytraeus albidus udvælges derefter (ved hjælp af stereomikroskop) for at starte en ny bestand. Alle andre orm kasseres. Ormens livscyklus er kort, da den når sin modenhed mellem 33 dage (ved 18 °C) og 74 dage (ved 12 °C). Kun bestande, der har været i laboratoriet i mindst fem uger (en generation) uden problemer, bør anvendes i en test.

Andre arter af Enchytraeus-slægten kan også anvendes, navnlig Enchytraeus luxuriosus. Denne art er en ægte jordinhabitant, som er beskrevet for nylig i (65). Hvis andre arter af Enchytraeus anvendes, skal de identificeres klart, og begrundelsen for valget af art skal anføres i rapporten.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) er en art, der tilhører samme gruppe som Enchytraeus luxuriosus. Det er ikke med sikkerhed dokumenteret, at den findes i det fri, og er kun blevet beskrevet fra dyrkede regnormebestande og kompostbunker (Römbke 2003). Dens oprindelige økologiske behov kendes derfor ikke. Nylige laboratorieforsøg i forskellige feltjorde har dog bekræftet, at denne art udviser bred tolerance over for jordegenskaber, som f.eks. pH og tekstur (Jänsch et al. 2005). I de senere år er denne art ofte blevet anvendt i økotoksikologiske forsøg på grund af dens ukomplicerede formering og test, f.eks. Kuperman et al. 2003). Den er dog lille (3-12 mm; 7 mm i gennemsnit (Westheide & Müller 1996), og det gør den vanskeligere at håndtere end Enchytraeus albidus. Hvis denne art bruges i stedet for Enchytraeus albidus, kan testbeholderen være mindre, men det er ikke nødvendigt. Det skal desuden tages i betragtning, at denne art reproduceres meget hurtigt og har en generationstid på mindre end 20 dage ved 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) og endda hurtigere ved højere temperaturer.

Enchytraeider af arten Enchytraeus albidus (og andre Enchytraeus-arter) kan avles i store plastikkasser (f.eks. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som er egnet til dyrkning af små orm) fyldt med en blanding af syntetisk jord og uforurenet havejord fri for additiver, som fås i handelen. Kompostmateriale bør undgås, da det kan indeholde toksiske kemikalier, som f.eks. tungmetaller. Fauna fjernes fra avlsjorden inden brug ved tredobbelt dybfrysning. Ren syntetisk jord kan også bruges, men reproduktionshastigheden kan være langsommere sammenlignet med hastigheden i blandede substrater. Substratet skal have en pH på 6,0 ± 0,5. Bestanden holdes i en inkubator ved en temperatur på 15 ± 2 °C uden lys. Temperaturer over 23 °C skal undgås. Det syntetiske/naturlige jord bør være fugtigt, men ikke vådt. Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene. Iltfattige betingelser skal undgås. Hvis der f.eks. bruges et låg, skal der være så mange huller i låget, at der kan ske en tilstrækkelig luftudskiftning. Jorden i avlekassen skal beluftes ved at blande den forsigtigt en gang om ugen.

▼M4

Ormene fodres mindst en gang om ugen ad libitum med havregryn, der anbringes i en fordybning på jordoverfladen og dækkes med jord. Hvis der stadig er foder tilbage i beholderen fra den forrige fodringsdato, tilpasses mængden af foder i overensstemmelse hermed. Hvis der vokser svampe på den resterende foder, erstattes den med en ny portion havregryn. For at stimulere reproduktionen kan havregrynene hver anden uge suppleres med vitaminberiget proteinpulver, som fås i handelen. Efter tre måneder overføres ormene til friskfremstillet dyrknings- eller avlesubstrat. Havregrynene, som skal opbevares i lukkede beholdere, autoklaveres eller opvarmes inden brug for at undgå infektion med melmider (f.eks. Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina) eller rovmider (f.eks. Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina). Efter desinfektion males foderet, så det nemt kan strøs ud på jordoverfladen. Gær eller fiskefoderet Tetra-Min® kan også bruges som foder.

Generelt er dyrkningsbetingelserne hensigtsmæssige, hvis ormene ikke forsøger at forlade substratet, bevæger sig hurtigt gennem jorden, har en blank overflade uden fastsiddende jordpartikler eller er mere eller mindre hvide, og hvis der ses orme i forskellige aldre. Orm betragtes faktisk som sunde, hvis de kontinuerligt formerer sig.

Yderligere udvalgte referencer

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W og Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W og Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. LANDPLANTETEST: FRØPLANTESPIRINGS- OG FRØPLANTE-VÆKSTTEST

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 208 (2006). Testmetoderne bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling og deres anvendelse til lovgivningsformål. Denne opdaterede testmetode har til formål at vurdere kemikaliers potentielle virkninger på frøplantespiring og -vækst. Den omfatter således ikke kroniske virkninger eller virkninger på reproduktionen (dvs. frøsætning, blomsterdannelse, frugtmodning). Der skal tages højde for eksponeringsbetingelser og egenskaber for det kemikalie, der skal testes, for at sikre at der anvendes passende testmetoder (f.eks. bør der tages højde for virkningerne af pH-værdien og associerede modioner i forbindelse med testning af metaller/metalforbindelser) (1). Denne testmetode omhandler ikke planter, der eksponeres for dampe fra kemikalier. Denne testmetode anvendes til testning af almindelige kemikalier, biocider og plantebeskyttelsesmidler (også kendt som pesticider). Den er udviklet på grundlag af eksisterende metoder (2)(3)(4)(5)(6)(7). Andre henvisninger med relevans for plantetestning blev også taget i betragtning (8)(9)(10). De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

2. Testen vurderer virkningerne på højerestående planters frøplantespiring og tidlige vækst efter eksponering for testkemikaliet i jord (eller en anden passende jordmatrix). Frø bringes i kontakt med jord, der er behandlet med testkemikaliet, og vurderes med hensyn til virkninger efter normalt 14-21 dage efter fremspiring af 50 % af frøplanterne i kontrolgruppen. De målte endepunkter er visuel bedømmelse af frøplantespiring, tørvægt for skud (alternativt vådvægt for skud) og i visse tilfælde skudhøjde samt en vurdering af synlige skadelige virkninger på forskellige dele af planten. Disse målinger og observationer sammenlignes med målinger og observationer for ubehandlede kontrolplanter.

3. Afhængigt af den forventede eksponeringsvej indarbejdes testkemikaliet enten i jorden (eller eventuelt i en syntetisk jordmatrix) eller påføres på jordoverfladen, hvilket svarer til kemikaliets potentielle eksponeringsvej. Indarbejdelse i jorden sker ved at behandle bulkjord. Efter tilsætning fyldes jorden i potter, og frø af den angivne planteart plantes i jorden. Påføring af kemikaliet på jordoverfladen sker på pottejord, hvori frøene allerede er plantet. Testenhederne (kontroller og behandlet jord plus frø) placeres derefter under betingelser, der er egnede til at fremme planternes spiring/vækst.

4. Testen kan udføres for at bestemme dosis/respons-kurven eller ved en enkelt koncentration/mængde som en grænsetest i henhold til formålet med undersøgelsen. Hvis resultater fra den enkle test af koncentrationen/mængden overstiger et vist toksicitetsniveau (f.eks. hvis der observeres virkninger, som overstiger x %), udføres der en test til bestemmelse af dosisinterval med henblik på at bestemme en øvre og nedre grænse for toksicitet efterfulgt af flere test af koncentration/mængde med henblik på en dosis/respons-kurve. Der bruges en passende statistisk analyse til at opnå en effektiv koncentration EC_x eller effektiv tilsat mængde ER_x (f.eks. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) for det eller de mest følsomme betragtede parametre. Nuleffektkoncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) kan også beregnes i testen.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

5. Følgende oplysninger er nyttige til identifikation af den forventede vej til eksponering for kemikaliet og til design af testen: strukturformel, renhed,

▼M6

vandopløselighed, opløselighed i organiske opløsningsmidler, 1-octanol/vand-fordelingskoefficient, sorptionsadfærd i jord, damptryk, kemisk stabilitet i vand og lys og bionedbrydelighed.

TESTENS VALIDITET

6. Hvis en test skal betragtes som valid, skal følgende resultatkrav opfyldes af kontrollerne:

— frøplantespiringen er mindst 70 %

— frøplanterne udviser ikke synlige fytotoksiske virkninger (f.eks. chlorose, nekrose, visnen, deformation af blade og stilke), og planterne udviser kun variation i vækst og morfologi, som er normal for den specifikke art

— den gennemsnitlige overlevelse for de fremspirede kontrolfrøplanter er mindst 90 % i hele undersøgelsens varighed

— miljøforholdene for en specifik art er identiske, og vækstsubstrater indeholder samme mængde jordmatrix, bæremedie eller substrat fra samme kilde.

REFERENCEKEMIKALIE

7. Et referencekemikalie kan testes med regelmæssige intervaller, for at kontrollere at udførelsen af testen og de specifikke testplanters respons og testbetingelserne ikke har ændret sig signifikant over tid. Alternativt kan historisk måling af biomasse eller vækst for kontroller bruges til at vurdere testsystemet i specifikke laboratorier og bruges som en foranstaltning til intern kvalitetskontrol i laboratorier.

BESKRIVELSE AF METODEN

Naturlig jord — syntetisk substrat

8. Planter kan dyrkes i potter med sandet jord (sandy loam), silt- og lerholdigt sandjord (loamy sand) eller sandet lerjord (sandy clay loam), der indeholder op til 1,5 % organisk kulstof (ca. 3 % organisk stof). Kommerciel pottejord eller syntetisk jordblanding, der indeholder op til 1,5 % organisk kulstof, kan også bruges. Lerjord bør ikke bruges, hvis testkemikaliet vides at have høj affinitet for ler. Markjord sigtes til en partikelstørrelse på 2 mm for at gøre jorden ensartet og fjerne grove partikler. Den endelige fremstillede jords type og tekstur, % organisk kulstof, pH og saltindhold samt elektrisk konduktivitet anføres i rapporten. Jorden skal være klassificeret i henhold til et standardklassifikationsskema (11). Jorden kan pasteuriseres eller varmebehandles for at mindske jordpatogeners virkning.

9. Naturlig jord kan vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne og øge variabiliteten på grund af forskellige fysisk-kemiske egenskaber og mikrobielle populationer. Disse variable ændrer vandkapaciteten, evnen til kemisk binding, iltningen og indholdet af næringsstoffer og sporstoffer. Ud over variationerne i disse fysiske faktorer vil der også være variationer i de kemiske egenskaber, såsom pH and redoxpotentiale, som kan påvirke testkemikaliets biotilgængelighed (12)(13)(14).

10. Syntetiske substrater bruges typisk ikke til testning af plantebeskyttelsesmidler, men de kan bruges til testning af almindelige kemikalier, i tilfælde hvor det ønskes at minimere den naturlige jords variabilitet og gøre testresultaterne mere sammenlignelige. Anvendte substrater bør bestå af inerte materialer, der minimerer interaktionen med testkemikaliet, opløsningsmidlet eller begge. Surt vasket kvartssand, mineraluld og glaspellets

▼M6

(f.eks. 0,35 til 0,85 mm i diameter) har vist sig at være egnede inerte materialer, der adsorberer testkemikaliet minimalt (15), hvilket sikrer, at kemikaliet er maksimalt tilgængeligt for frøplanten ved optagelse gennem rødderne. Uegnede substrater er f.eks. vermiculit, perlit eller andre stærkt absorberende materialer. Der tilføres næringsmidler, for at sikre at planterne ikke stresses som følge af mangel på næringsstoffer, hvilket om muligt vurderes ved kemisk analyse eller visuel vurdering af kontrolplanterne.

Kriterier for udvælgelse af testarter

11. Der bør sikres en tilstrækkelig bred udvælgelse af arter, f.eks. ud fra deres taksonomiske mangfoldighed i planteriget, fordeling, abundans, artsspecifikke livscykluskarakteristika og område for deres naturlige forekomst, således at der udvikles et responsområde (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Følgende karakteristika for de eventuelle testarter bør tages i betragtning i forbindelse med udvælgelsen:

— arterne har ensartede frø, som er umiddelbart tilgængelige fra pålidelige standardfrøkilder, og som producerer konstant, pålidelig og ensartet spiring samt ensartet frøplantevækst

— planten er egnet til testning i laboratorium og kan give pålidelige og reproducerbare resultater i og på tværs af testfaciliteter

— testarternes følsomhed skal stemme overens med responser hos planter i miljøet, der eksponeres for kemikaliet

— de har i en vis udstrækning være brugt i tidligere toksicitetstest, og deres brug i f.eks. herbicidbioassays, screening for tungmetaller, salt- eller mineralbelastningstest eller allelopatiundersøgelser indikerer følsomhed over for en lang række stressfaktorer

— de er forenelige med testmetodens dyrkningsbetingelser

— de opfylder testens validitetskriterier.

Nogle af de testarter, der historisk har været brugt mest, er opført på listen i tillæg 2, og potentielle vilde arter er opført på listen i tillæg 3.

12. Det antal arter, der skal testes, afhænger af de relevante lovgivningskrav og er derfor ikke angivet i testmetoden.

Applikation af testkemikaliet

13. Kemikaliet skal tilsættes i et passende substrat (f.eks. vand, acetone, ethanol, polyethylenglycol, gummi arabicum, sand). Blandinger (formulerede produkter eller formuleringer), som indeholder aktive bestanddele og forskellige adjuvanser, kan også testes.

Indarbejdelse i jord/syntetisk substrat

14. Kemikalier, der er vandopløselige eller opslæmmede i vand, kan tilsættes til vand, hvorefter opløsningen blandes med jord ved hjælp af en passende blander. Denne type test kan være velegnet, hvis eksponeringen for kemikaliet foregår gennem jord eller jordporevand, og kemikaliet mistænkes for at blive optaget gennem rødderne. Jordens vandholdende evne bør ikke overstiges med tilsætningen af testkemikaliet. Det tilsatte volumen vand skal være det samme for hver testkoncentration, men skal udelukkende forhindre, at jorden klumper sammen som et agglomerat.

▼**M6**

15. Kemikalier med lav vandopløselighed opløses i et egnet flygtigt opløsningsmiddel (f.eks. acetone, ethanol) og blandes med sand. Opløsningsmidlet kan derefter fjernes fra sandet ved hjælp af en luftstrøm under konstant blanding af sandet. Det behandlede sand blandes med forsøgsjorden. Der klargøres en anden kontrol, som kun tilsættes sand og opløsningsmiddel. Der tilsættes lige dele sand, iblandet opløsningsmiddel, som fjernes, til alle behandlingsniveauer og den anden kontrol. Når der er tale om faste, uopløselige testkemikalier, blandes tør jord og kemikaliet i en passende blander. Herefter tilsættes jorden til potterne, og frøene sås straks.

16. Når der anvendes et syntetisk substrat i stedet for jord, kan kemikalier, der er opløselige i vand, opløses i næringsopløsningen umiddelbart inden testens begyndelse. Kemikalier, der ikke er opløselige i vand, men som kan opslæmmes i vand med et opløsningsmiddel som bærestof, tilsættes med bærestoffet til næringsopløsningen. Vanduopløselige kemikalier, for hvilke der ikke forefindes noget ikke-toksisk vandopløseligt bærestof, opløses i et passende flygtigt opløsningsmiddel. Opløsningen blandes med sand eller glaspellets, anbringes i et roterende vakuumapparat og inddampes, hvilket giver en ensartet belægning af kemikalie på sand eller pellets. En afvejet mængde pellets ekstraheres med det samme organiske opløsningsmiddel, og kemikaliet analyseres, inden potterne fyldes.

Overfladepåføring

17. Når der er tale om plantebeskyttelsesmidler, påføres testkemikaliet ofte ved sprøjtning på jordoverfladen. Alt udstyr, der anvendes til testene, herunder udstyr til klargøring og tilførsel af testkemikaliet, skal være udformet således, at test med udstyret kan udføres nøjagtigt og giver en reproducerbar dækning. Dækningen skal være ensartet på alle jordoverflader. Det skal sikres, at kemikalier ikke adsorberer til eller reagerer med udstyr (f.eks. plastslanger og lipofile kemikalier eller ståldele og -elementer). Testkemikaliet sprøjtes på jordoverfladen, idet påføring med en almindelig marksprøjte efterlignes. Generelt bør sprøjtemængden ligge inden for det interval, der er normal praksis inden for landbruget, og volumenerne (mængden af vand osv.) anføres i rapporten. Der vælges en dysetype, som giver ensartet dækning af jordoverfladen. Hvis der påføres opløsningsmidler og bærestoffer, klargøres en anden gruppe af kontrolplanter, som kun modtager opløsningsmidlet/bærestoffet. Det er ikke nødvendigt i forbindelse med plantebeskyttelsesmidler, der testes som formuleringer.

Kontrol af koncentrationen/mængden af testkemikalie

18. Påføringskoncentrationerne/-mængderne skal kontrolleres under anvendelse af passende analytisk kontrol. Når der er tale om opløselige kemikalier, kan kontrollen af alle testkoncentrationer/-mængder bekræftes ved analyse af den testopløsning, der har den højeste koncentration, med dokumentation af efterfølgende fortynding og brug af kalibreret udstyr (f.eks. kalibreret analyseudstyr i glas, kalibreret sprøjteudstyr til påføring). Når der er tale om uopløselige kemikalier, skal kontrol af forbindelser foregå ved vejning af det testkemikalie, der tilsættes til jorden. Hvis der stilles krav om påvisning af homogenitet, kan analyse af jorden være nødvendig.

FREMGANGSMÅDE

Testdesign

19. Frø af samme art plantes i potter. Antallet af frø, der plantes pr. potte, afhænger af art, pottestørrelse og testens varighed. Antallet af planter pr. potte bør være således, at der sikres hensigtsmæssige vækstbetingelser, og planterne ikke kommer til at stå for tæt i testperioden. Den maksimale plantetæthed er på ca. 3-10 frø pr. 100 cm^2 afhængigt af frøenes størrelse. Det anbefales f.eks. at anvende en til to majs-, sojabønne-, tomat-, agurke- eller sukkerroeplanter pr. beholder på 15 cm; tre raps- eller ærteplanter pr.

▼M6

beholder på 15 cm og 5-10 løgfrø, hvedefrø eller andre små frø pr. beholder på 15 cm. Antallet af frø og replikatpotter (replikaten defineres som en potte, og planter i samme potte udgør derfor ikke en replikat) bør være tilstrækkeligt til optimal statistisk analyse (21). Det skal bemærkes, at variabiliteten vil være større for testarter, hvor der bruges færre store frø pr. potte (replikat), end for testarter, hvor det er muligt at bruge et større antal små frø pr. potte. Denne variabilitet kan minimeres ved at plante samme antal frø i hver potte.

20. Der bruges kontrolgrupper, for at sikre at de observerede virkninger kun er knyttet til eller kan tilskrives eksponeringen for testkemikaliet. En hensigtsmæssig kontrolgruppe skal på alle måder være identisk med testgruppen, bortset fra eksponeringen for testkemikaliet. Inden for en given test skal alle testplanter, herunder kontrollerne, være fra samme kilde. For at forhindre bias stilles der krav om vilkårlig tildeling af test- og kontrolpotter.

21. Frø belagt med et insekticid eller et fungicid (dvs. »behandlede« frø) bør undgås. Visse tilsynsmyndigheder tillader dog brug af visse ikke-systemiske kontaktfungicider (f.eks. captan, thiram) (22). Hvis frøbårne patogener er et problem, kan frøene dyppes kortvarigt i en svag 5 %-hypochloritopløsning og efterfølgende skylles grundigt i rindende vand og tørres. Afhjælpende behandling med andre plantebeskyttelsesmidler er ikke tilladt.

Testbetingelser

22. Testbetingelserne skal ligne de betingelser, der er nødvendige for testarternes og -varieteternes normale vækst (tillæg 4 indeholder eksempler på testbetingelser). De spirende planter skal opbevares i henhold til god praksis for havebrug i kamre med kontrolleret miljø, klimakamre eller drivhuse. Når der bruges sådanne vækstrum, omfatter en sådan praksis normalt kontrol og registrering med passende hyppighed (f.eks. dagligt) af temperatur, luftfugtighed, kuldioxidkoncentration, lys (intensitet, bølgelængde, fotosyntetisk aktiv stråling) og lysperiode, vanding osv. for at sikre fornuftig plantevækst som bedømt ved kontrolplanterne af de udvalgte arter. Temperaturen i drivhuse skal kontrolleres ved hjælp af ventilations-, varme- og/eller kølesystemer. Følgende betingelser anbefales generelt ved testning i drivhus:

— temperatur: 22 °C ± 10 °C

— fugtighed: 70 % ± 25 %

— lysperiode: mindst 16 timers lys

— lysintensitet: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Det kan være nødvendigt med supplerende belysning, hvis intensiteten falder til under 200 $\mu E/m^2/s$, bølgelængde 400-700 nm, bortset fra visse arter, der har mindre behov for lys.

Miljøforholdene skal overvåges og registreres under undersøgelsen. Planterne dyrkes i ikke-porøse plastpotter eller glaserede potter med en bakke eller underskål under potten. Potterne kan flyttes med jævne mellemrum for

▼M6

at minimere variabiliteten i planternes vækst (som følge af forskelle i testbetingelserne i vækstrummet). Potterne skal være store nok til at tillade normal vækst.

23. Jorden kan tilsættes næringsstoffer efter behov for at bevare en fornuftig vækstkraft. Behovet og tidspunkterne for tilsætning af næringsstoffer kan vurderes ved iagttagelse af kontrolplanterne. Bundvanding af testbeholdere (f.eks. ved at bruge glasfibervæger) anbefales. Topvanding kan dog bruges indledende for at fremme frøspiring og letter desuden kemikaliets bevægelse ned i jorden, når det påføres på jordoverfladen.

24. De specifikke vækstbetingelser skal være egnede til testarterne og det undersøgte testkemikalie. Kontrolplanter og behandlede planter skal opbevares under samme miljøforhold, men der skal træffes passende forholdsregler for at forhindre krydseksponering (f.eks. for flygtige kemikalier) mellem forskellige behandlinger og kontrolplanters eksponering for testkemikaliet.

Testning ved en enkelt koncentration/mængde

25. Med henblik på at bestemme den passende koncentration/mængde af et kemikalie til udførelse af en test ved en enkelt koncentration eller mængde (provokations-/grænsetest) skal der tages højde for en række faktorer. I forbindelse med almindelige kemikalier er der bl.a. tale om kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. I forbindelse med plantebeskyttelsesmidler skal der tages højde for testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og anvendelsesmønster, dets maksimale koncentration eller spredemængde, antal påføringer pr. sæson og/eller persistens. For at bestemme om et almindeligt kemikalie har fytotoksiske egenskaber, kan det være hensigtsmæssigt at teste ved et maksimalt niveau på 1 000 mg/kg tør jord.

Test til bestemmelse af dosisinterval

26. Om nødvendigt kan en indledende test til bestemmelse af dosisinterval udføres, for at finde ud af hvilke koncentrationer/mængder, der skal testes i dosis/respons-hovedundersøgelsen. I forbindelse med den indledende test skal der være stor afstand mellem testkoncentrationerne/-mængderne (f.eks. 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg tør jord). I forbindelse med plantebeskyttelsesmidler kan koncentrationerne/mængderne være baseret på den anbefalede eller maksimale koncentration eller spredemængde, f.eks. 1/100, 1/10, 1/1 af den anbefalede/maskimale koncentration eller spredemængde.

Testning ved flere koncentrationer/mængder

27. Formålet med testen ved flere koncentrationer/mængder er at fastlægge et dosis/respons-forhold og bestemme en EC_x- eller ER_x-værdi for spiring, biomasse og/eller visuelle virkninger sammenlignet med ikke-eksponerede kontroller i henhold til tilsynsmyndighedernes krav.

28. Antallet af og afstanden mellem koncentrationerne eller mængderne skal være tilstrækkelig til at fastlægge et pålideligt dosis/respons-forhold og en regressionsligning og beregne EC_x eller ER_x. De udvalgte koncentrationer/mængder skal omfatte de EC_x- eller ER_x-værdier, som skal bestemmes. Hvis der f.eks. skal bestemmes en EC_{50}-værdi, vil det være ønskeligt at teste ved mængder, som har en virkning på 20-80 %. For at opnå dette er det anbefalede antal testkoncentrationer/-mængder mindst fem i en geometrisk serie plus ikke-behandlet kontrol med en afstandsfaktor, som ikke

▼M6

overstiger tre. Der skal være mindst fire replikater og i alt 20 frø pr. behandlings- og kontrolgruppe. Det kan være nødvendigt med flere replikater af visse planter med lav spireevne eller varierende vækstformer for at øge testens statistiske styrke. Hvis der bruges et større antal testkoncentrationer/-mængder, kan antallet af replikater reduceres. Hvis NOEC skal beregnes, kan det være nødvendigt med flere replikater for at opnå den ønskede statistiske styrke (23).

Observationer

29. Under observationsperioden, dvs. 14-21 dage efter at 50 % af kontrolplanterne (også eventuelle kontrolplanter med opløsningsmiddel) har spiret, iagttages planterne hyppigt (mindst ugentligt og om muligt dagligt), for at konstatere om der forekommer spiring og visuel fytotoksicitet og dødelighed. Ved testens afslutning registreres målingen af den procentvise spiring og de overlevende planters biomasse samt synlige skadelige virkninger på forskellige dele af planten. Sidstnævnte omfatter abnormiteter i de spirede frøplanters udseende, hæmmet vækst, chlorose, misfarvning, dødelighed og påvirkning af planternes udvikling. Slutbiomassen kan måles ved hjælp af de overlevende planters endelige gennemsnitlige tørvægt for skud ved at høste skuddet ved jordoverfladen og tørre det til konstant vægt ved 60 °C. Alternativt kan slutbiomassen måles ved hjælp af vådvægt for skud. Skuddets højde kan være et andet endepunkt, hvis tilsynsmyndighederne kræver det. Der kan anvendes et ensartet scoringssystem for visuelle skader til evaluering af de observerbare toksiske responser. Eksempler på kvalitative og kvantitative visuelle bedømmelser findes i henvisning (23) (24).

DATA OG RAPPORTERING

Statistisk analyse

Test ved en enkelt koncentration/mængde

30. Data for hver planteart analyseres ved hjælp af en passende statistisk metode (21). Effektniveauet ved testkoncentrationen/-mængden anføres i rapporten, eller det anføres, at der ikke er opnået en given effekt ved testkoncentrationen/-mængden (eksempel: < *x* % effekt observeret ved koncentration eller mængde *y*)

Test ved flere koncentrationer/mængder

31. Et dosis/respons-forhold beregnes ved hjælp af en regressionsligning. Der kan bruges forskellige modeller: Logit-, probit-, Weibull-, Spearman-Karber- og Trimmed Spearman-Karber-metoderne kan f.eks. være hensigtsmæssige metoder til beregning af EC_x eller ER_x (f.eks. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) og værdiens konfidensgrænser som kvantale data. I forbindelse med frøplanternes vækst (vægt og højde) som kontinuerte endepunkter kan EC_x eller ER_x og værdiens konfidensgrænser beregnes ved hjælp af en passende regressionsanalyse (f.eks. Bruce-Versteegs ikke-lineære regressionsanalyse (25)). R^2 skal om muligt være 0,7 eller højere for de mest følsomme arter, og de anvendte testkoncentrationer/-mængder skal omfatte effekter på 20-80 %. Hvis NOEC skal beregnes, foretrækkes anvendelse af stærke statistiske test, som udvælges på grundlag af datafordeling (21)(26).

Testrapport

32. Testrapporten skal indeholde en præsentation af resultaterne af undersøgelsen og en detaljeret beskrivelse af testbetingelserne, en grundig diskussion af resultaterne samt analyser af dataene og de konklusioner, der er draget af analyserne. Rapporten skal indeholde et resume i tabelform og et sammendrag af resultaterne. Rapporten skal indeholde følgende:

▼**M6**

Testkemikalie:

— kemisk identifikation, relevante egenskaber for det testede kemikalie (f.eks. log P_{ow}, vandopløselighed, damptryk og oplysninger om skæbne og adfærd i miljøet, hvis de foreligger)

— oplysninger om klargøring af testopløsningen og kontrol af testkoncentrationer, jf. punkt 18.

Testede arter:

— oplysninger om testorganismer: arter/sorter, plantefamilier, videnskabelige og generiske navne, kilder og frøets historie beskrevet så udførligt som muligt (dvs. leverandørens navn, spiringsprocent, frøstørrelse, klasse, parti- eller batchnummer, frøår eller vækstsæson, hvor det er indsamlet, dato for spiringsbedømmelse), levedygtighed osv.

— antal testede mono- og di-cotyledon-arter

— begrundelse for valg af art

— beskrivelse af opbevaring, behandling og vedligeholdelse af frø.

Testbetingelser:

— testfacilitet (f.eks. vækstkammer, klimakammer eller drivhus)

— beskrivelse af testsystem (f.eks. pottedimensioner, pottemateriale og jordmængde)

— jordegenskaber (tekstur eller jordtype: jordpartikelfordeling og -klassifikation, fysisk- kemiske egenskaber, herunder % organisk stof, % organisk kulstof og pH)

— klargøring af jord/substrat (f.eks. jord, syntetisk jord, sand mv.) inden testen

— beskrivelse af eventuelt næringssubstrat

— anvendelse af testkemikaliet: beskrivelse af anvendelsesmetode, beskrivelse af udstyr, eksponeringshastighed og -mængde, herunder kontrol af kemikaliet, beskrivelse af kalibreringsmetode og beskrivelse af miljøforhold under anvendelsen

— vækstbetingelser: lysintensitet (f.eks. fotosynteseaktiv solindstråling), lysperiode, maks./min. temperaturer, vandingstidspunkter og -metode, gødning

— antal frø pr. potte, antal planter pr. dosis, antal replikater (potter) pr. eksponeringsmængde

— type og antal kontroller (negative og/eller positive kontroller, eventuel opløsningsmiddelkontrol)

— testens varighed.

Resultater:

— tabel over alle endepunkter for hver replikat, testkoncentration/-mængde og art

— spiringer, antal og procent, sammenlignet med kontroller

— biomassebestemmelse (tørvægt eller vådvægt for skud) af planterne som procentdel af kontrollerne

▼M6

— skudhøjde for planterne som procentdel af kontrollerne, hvis målt

— procent visuelle skader og kvalitativ og kvantitativ beskrivelse af visuelle skader (chlorose, nekrose, visnen, deformation af blade og stilke samt ingen virkninger) forårsaget af testkemikaliet sammenlignet med kontrolplanterne

— beskrivelse af den bedømmelsesskala, der bruges til at vurdere visuelle skader, hvis der foretages en visuel bedømmelse

— ved undersøgelser med en enkelt mængde skal skaderne anføres i rapporten i procent

— EC_x- eller ER_x-værdier (f.eks. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) og tilhørende konfidensgrænser. Når der foretages regressionsanalyser anføres standardfejl for regressionsligningen og standardfejl for individuelle vurderinger af parametre (f.eks. hældning, skæring)

— NOEC-værdier (og LOEC-værdier), hvis de er beregnet

— beskrivelse af de anvendte statistiske metoder og forudsætninger

— grafisk visning af data og dosis/respons-forhold for testarterne.

Afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

(1) G. Schrader, K. Metge og M. Bahadir (1998), Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods, Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1993), ISO 11269-1, Soil Quality — Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995), ISO 11269-2, Soil Quality — Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM) (2002), E 1963-98, Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA (1982), FIFRA, 40CFR, Part 158.540, Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA (1996), OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850, Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence)

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201 (1982), Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1 (1993), Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) C. Boutin, K. E. Freemark og C. J. Keddy (1993), Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation, Technical Report Series No. 145, Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) R. Forster, U. Heimbach, C. Kula og P. Zwerger (1997), Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna), Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) B. Hale, J. C. Hall, K. Solomon og G. Stephenson (1994), A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) L. J. Audus (1964), Herbicide behaviour in the soil, in: L. J. Audus ed., *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, kapitel 5, s. 163-206.

(13) M. L. Beall Jr. og R. G. Nash (1969), Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) G. D. Beetsman, D. R. Kenney og G. Chesters (1969), Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1987), Environmental Assessment Technical Handbook, Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, s. 14 ff., FDA, Washington, DC.

(16) R. A. McKelvey, J. P. Wright, J. L. Honegger og L. W. Warren (2002), A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing, Pest Management Science vol. 58:1161-1174.

(17) C. Boutin, N. Elmegaard og C. Kjær (2004), Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment, Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) C. Boutin og C. A. Rogers (2000), Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases, Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) C. Boutin og J. L. Harper (1991), A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats, J. Ecol. 9:155-271.

(20) C. Boutin, H.-B. Lee, T. E. Peart, S. P. Batchelor og R. J. Maguire (2000), Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species, Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006), Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Series on Testing and Assessment No 54, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling, Paris.

(22) K. K. Hatzios og D. Penner (1985), Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants, Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) P. B. Hamill, P. B. Marriage og G. Friesen. (1977), A method for assessing herbicide performance in small plot experiments, Weed Science 25:386-389.

(24) R. E. Frans og R. E. Talbert (1992), Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response, in: B. Truelove (Ed.), Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Kapitel C.33 i dette bilag: Formeringstest — regnorme (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

Aktiv bestanddel (eller aktivstof) er et materiale, der er beregnet til at sikre en specifik biologisk effekt (f.eks. insektbekæmpelse, plantesygdomsbekæmpelse eller ukrudtsbekæmpelse i behandlingsområdet), kaldes også aktiv bestanddel/aktivstof af teknisk kvalitet.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Plantebeskyttelsesmidler eller pesticider er materialer med en specifik biologisk aktivitet, som bruges bevidst til at beskytte planter mod skadegørere (f.eks. svampesygdomme, insekter og konkurrerende planter).

EC_x-koncentration med x % effekt eller ER_x-mængde med x % effekt er den koncentration eller mængde, der forårsager en uønsket ændring på x % i det endepunkt for en test, der måles i forhold til kontrollen (eksempelvis ville en reduktion på 25 % eller 50 % i frøplantespiring, skudvægt eller endeligt antal planter eller en stigning på 25 % eller 50 % i visuelle skader give en værdi på henholdsvis EC_{25}/ER_{25} eller EC_{50}/ER_{50}).

Spiring er, når skuddet eller kimbladet viser sig over jordoverfladen.

Formulering er det kommercielt formulerede produkt, der indeholder den aktive bestanddel — kaldes også det endelige præparat ([1]) eller »typical end-use product« (TEP).

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste koncentration af testkemikaliet, hvor der observeres en virkning. I denne test har LOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen og er højere end NOEC-værdien.

Planter, der ikke er målarter: De planter, der ikke tilhører målgruppen. Ved plantebeskyttelsesmidler er der sædvanligvis tale om planter uden for behandlingsområdet.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Fytotoksicitet: Skadelige afvigelser (ved måling og visuelle bedømmelse) fra planternes normale mønster for udseende og vækst som reaktion på et givet kemikalie.

Replikat er den forsøgsenhed, der repræsenterer kontrolgruppen og/eller behandlingsgruppen. I disse undersøgelser defineres potten som replikaten.

Visuel bedømmelse: Bedømmelse af visuelle skader baseret på iagttagelse af plantetæthed, vækstkraft, misdannelse, chlorose, nekrose og generelt udseende sammenlignet med en kontrol.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

([1]) Endeligt præparat: det kommercielt tilgængelige formulerede produkt, som indeholder det aktive kemikalie (den aktive bestanddel).

▼**M6**

Tillæg 2

Liste over arter, der historisk har været anvendt til plantetestning

Familie	Art	Generisk navn
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Gulerod
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Solsikke
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Salat
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Gul sennep
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kinakål
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Kål
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Majroe
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Havekarse
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Radise
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Sukkerroe
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Almindelig agurk
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Sojabønne
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungbønne
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Havebønne
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Almindelig ært
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Bukkehornsfrø
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Kællingetand
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Rødkløver
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Fodervikke
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Hør
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Boghvede
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tomat

▼**M6**

Familie	Art	Generisk navn
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Løg
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Havre
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Byg
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Almindelig rajgræs
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Ris
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Rug
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Sorghum, durra
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Hvede
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Majs

▼M6

Tillæg 3

Liste over potentielle vilde arter

OECD — vilde arter, der kan anvendes til testning af toksicitet for planter.

Bemærk: Nedenstående tabel indeholder oplysninger om 52 vilde arter (henvisninger er anført i parentes for hver art). De angivne spiringshastigheder stammer fra offentliggjort litteratur og er blot angivet som generel vejledning. Individuelle erfaringer kan variere afhængigt af frøkilden og andre faktorer.

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (hvas randfrø)	A, B forstyrrede områder, hække, græsarealer (16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	kold stratificering (7, 14, 18, 19) modning kan være nødvendig (19) spiring hæmmes af mørke (1, 19) ingen særlig behandling (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (almindelig tusindfryd)	P græsarealer, agerjord, græsplæner (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (18, 19) ingen særlig behandling (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (kornblomst)	A marker, vejkanter, åbne områder (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	ingen særlig behandling (2, 4)	POST (2, 4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (sort knopurt)	P marker, vejkanter, åbne områder (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	modning kan være nødvendig (18, 19) spiring hæmmes af mørke (19) ingen særlig behandling (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (lægealant)	P fugtige, forstyrrede områder (16)	1-1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		ingen særlig behandling (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
Leontodon hispidus (stivhåret borst)	P marker, vejkanter, forstyrrede områder (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (17, 18, 19) ingen særlig behandling (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (håret solhat)	B, P forstyrrede områder (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	ingen særlig behandling (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (canadisk gyldenris)	P græsarealer, åbne områder (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	blandes med lige dele sand, og gennemblød i 500 ppm Ga i 24 timer (11) ingen særlig behandling (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (almindelig brodfrø)	A marker, åbne områder (16)	25-61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		spiring kan hæmmes af mørke (1) gennemblødes i varmt vand i 12 timer (29)	PRÆ & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (tornet brodfrø)	A åbne områder (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 6)		ardannelse (14) ingen særlig behandling (6)	PRÆ & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (skræppe-brodfrø)	A marker, åbne områder (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		ingen særlig behandling (6, 14, 21)	PRÆ & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (engkarse)	P marker, vejkanter, græsplæner (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) ingen særlig behandling (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (trævlekrone)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	modning kan være nødvendig (18) ingen særlig behandling (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (hvidmelet gåsefod)	A markkanter, forstyrrede områder (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	behandling varierer afhængigt af frøfarve (19) dvaletilstand ved tør opbevaring (19) spiring hæmmes af mørke (1, 18, 19) kold stratificering (18) ingen særlig behandling (14, 34)	PRÆ & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (prikbladet perikon)	P marker, agerjord, åbne områder (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (1, 18, 19) ingen særlig behandling (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (vedbendpragtsnerle)	A vejkanter, åbne områder, kornmarker (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) ingen særlig behandling (6, 21)	PRÆ & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (rund fladaks)	P agerjord, græsarealer, vejkanter (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (6, 10, 14)	PRÆ & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (almindelig kællingetand)	P græsarealer, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	ardannelse (14, 19) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (18, 19) ingen særlig behandling (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid [1] og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst [2]	Plantedybde (mm) [3]	Tid til spiring (dage) [4]	Særlige behandlinger [5]	Toksicitetstest [6]	Leverandør af frø [7]	Andre henvisninger [8]
Senna obtusifolia (kassia, sicklepod)	A fugtige skove (16)	23-28 9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6, 9)		frø gennemblødes i vand i 24 timer (9) ardannelse (14) frøenes levedygtighed varierer afhængigt af farve (1) ingen særlig behandling (6)	POST (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (hamp)	A alluvial jord (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		frø gennemblødes i vand i 24 timer (9) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) ingen særlig behandling (21)	PRÆ & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (rødkløver)	P marker, vejkanter, agerjord (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	ardannelse (14, 18) modning kan være nødvendig (19) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1, 19) ingen særlig behandling (5)	POST 5)	A, E, F	
LAM IAC E AE *Leonurus cardiaca* (almindelig hjertespand)	P åbne områder (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 4)		ingen særlig behandling (4, 14)	POST 4)	F	
Mentha spicata (grøn mynte)	P fugtige områder (16)	2,21 4)		0 4)		ingen særlig behandling 4)	POST 4)	F	
Nepeta cataria (almindelig katteurt)	P forstyrrede områder (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 4)		ingen særlig behandling (2, 4, 14)	POST (2, 4)	F	

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
Prunella vulgaris (almindelig brunelle)	P agerjord, græsarealer, forstyrrede områder (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) bedre spiring med større frø (1) ingen særlig behandling (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (lægegaltetand)	P græsarealer, markkanter (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	ingen særlig behandling (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (kinajute)	A marker, åbne områder (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	ardannelse (14) ingen særlig behandling (5, 10, 21)	PRÆ & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (tornet sida)	A marker, vejkanter (16)	3.8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		ardannelse (14) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) ingen særlig behandling (6, 21)	PRÆ & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (kornvalmue)	A marker, agerjord, forstyrrede områder (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	kold stratificering og ardannelse (1, 19, 32) ingen særlig behandling (4, 14, 29)	POST 4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (almindelig hvene)	græsplæner, græsarealer (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	spiring hæmmes af mørke (1, 17-19) ingen særlig behandling (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (agerrævehale)	A marker, åbne områder (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	ardannelse (14) behandles med 101 mg/l KNO3 (14) varm stratificering (1) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (34)	PRÆ & POST (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid [1] og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst [2]	Plantedybde (mm) [3]	Tid til spiring (dage) [4]	Særlige behandlinger [5]	Toksicitetstest [6]	Leverandør af frø [7]	Andre henvisninger [8]
Avena fatua (flyvehavre)	A dyrkede områder, åbne områder (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	ardannelse (7, 32) mørke hæmmer spiring (1) kold stratificering (1, 18) ingen særlig behandling (6, 10, 14)	PRÆ & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (taghejre)	A marker, vejkanter, agerjord (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		modningsperiode (1, 7, 32) spring hæmmes af lys (1) ingen særlig behandling (14)	PRÆ & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (almindelig kamgræs)	P marker, vejkanter, åbne områder (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (19) ingen særlig behandling (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (blodhirse)	A marker, græsplæner, åbne områder (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	ardannelse, kold stratificering og modning (1, 7, 14, 32) behandles med 101 mg/l KNO3 (14) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (21)	PRÆ & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (almindelig hanespore)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		ardannelse (7, 32) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) ingen særlig behandling (3, 14, 21)	PRÆ & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (canadisk hundekvik)	P bredområder, forstyrrede områder (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	ingen særlig behandling (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (engsvingel)	P marker, fugtige områder (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	ingen særlig behandling (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
Hordeum pusillum (liden byg)	A græsarealer, vejkanter, åbne områder (16)	3,28 (14)				varm stratificering (1) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1)	PRÆ (31)		7
Phleum pratense (engrottehale)	P græsarealer, agerjord, forstyrrede områder (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	spiring hæmmes af mørke (19) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (17) ingen særlig behandling (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (snerlepileurt)	A åbne områder, vejkanter (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		kold stratificering i 4-8 uger (1, 2, 4, 20, 29) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1)	PRÆ & POST (1, 2, 20, 28, 31)	A	32
Polygonum lapathifolium (knudet pileurt)	A fugtig jord (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (1) spiring hæmmes af mørke (18) kold stratificering (1) ingen særlig behandling (5)	PRÆ & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (pennsylvansk pileurt)	A marker, åbne områder (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		kold stratificering i 4 uger ved 0-5 °C (1, 29) spiring hæmmes af mørke (1)	PRÆ (31)	A, E	
Polygonum periscaria (ferskenpileurt)	A forstyrrede områder, agerjord (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	ardannelse, kold stratificering, Ga-behandling (14) kold stratificering, modning (17-19) spiring hæmmes af mørke (19) ingen særlig behandling (13)	POST (13)	A	32

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
Rumex crispus (kruset skræppe)	P agerjord, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) modning kan være nødvendig (18) ingen særlig behandling (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (rød arve)	A agerjord, åbne områder, forstyrrede områder (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	kold stratificering, Ga-behandling (1, 14, 18, 19, 32) spiring kræver lys (1) ingen særlig behandling (2, 4)	POST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (bidende ranunkel)	P agerjord, vejkanter, åbne områder (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	ingen særlig behandling (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (febernellikerod)	P hække, fugtige områder (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) varm stratificering (1) ingen særlig behandling (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (burresnerre)	A agerjord, fugtige områder, forstyrrede områder (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	kold stratificering (1, 18, 19) spiring ikke påvirket af strålingsintensitet (18, 19) spiring hæmmes af mørke (1) ingen særlig behandling (6, 14)	PRÆ & POST (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILIE Artens botaniske navn (dansk generisk navn)	Levetid ([1]) og levested	Vægt af frø (mg)	Lysperiode til spiring eller vækst ([2])	Plantedybde (mm) ([3])	Tid til spiring (dage) ([4])	Særlige behandlinger ([5])	Toksicitetstest ([6])	Leverandør af frø ([7])	Andre henvisninger ([8])
Galium mollugo (hvid snerre)	P levende hegn, åbne områder (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		ingen særlig behandling (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (almindelig fingerbøl)	B, P hække, åbne områder (16, 19)	0,1 -0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (1, 17-19) ingen særlig behandling (4, 22-26)	POST (4, 22-26)	D, G, F	
Veronica persica (storkronet ærenpris)	A agerjord, åbne områder, forstyrrede områder (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	spiring hæmmes af mørke (18, 19) kold stratificering (18) ingen særlig behandling (14)	PRÆ & POST (28)	A	32

([1]) A = enårige (Annuals), B = toårige (Biennials), P = flerårige (Perennials).
([2]) Henvisning 11, 14 og 33 henviser til det forhold mellem lys (L = light) og mørke (D = darkness), der er nødvendigt for spiring. Henvisning 3, 6, 9, 10, 13 og 20 henviser til vækstbetingelser i drivhuse.
([3]) 0 mm indikerer, at frøene blev sået på jordoverfladen, eller at frøene har brug for lys for at kunne spire.
([4]) Det angivne antal er det antal dage, inden for hvilket en procentdel af frøene spirede i henhold til den angivne henvisning, f.eks. tre dage (50 %) spiring (henvisning 19).
([5]) Varigheden af modning og/eller stratificering ikke altid tilgængelig. Bortset fra krav om kuldebehandling er temperaturbetingelser ikke angivet, eftersom der er begrænset temperaturkontrol i forbindelse med testning i drivhus. De fleste frø spirer ved de almindelige temperaturudsving, der er i drivhuse.
([6]) Indikerer, at arter blev anvendt i en test af herbiciders toksicitet for planter før (PRÆ) og/eller efter (POST) spiring.
([7]) Et eller flere eksempler på kommercielle leverandører af frø.
([8]) To alternative anvendte henvisninger.

▼**M6**

Angivne leverandører af frø

Leverandør-ID	Leverandørinformation
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344-4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586-3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431-7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873-3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 (0)1256 6022668 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274-7333 www.thompson-morgan.com

ANGIVNE KILDER:

(1) C. C. Baskin og J. M. Baskin (1998), Seeds, Academic Press, Toronto.

(2) L. G. Blackburn og C. Boutin (2003), Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®), Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) C. Boutin, H.-B. Lee, T. Peart, P. S. Batchelor og R. J. Maguire (2000), Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species, Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) C. Boutin, N. Elmegaard og C. Kjær (2004), Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment, Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) V. Breeze, G. Thomas og R. Butler (1992), Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides, Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) R. A. Brown og D. Farmer (1991), Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides, in: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang og M. A. Lewis, eds., American Society for Testing & Materials, Philadelphia, s. 197-208.

▼**M6**

(7) D. D. Buhler og M. L. Hoffman (1999), Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants, Weed Science Society of America, K. Lawrence.

(8) A. R. Clapham, T. G. Tutin og E. F. Warburg (1981), Excursion flora of the British Isles, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.

(9) P. A. Clay og J. L. Griffin (2000), Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications, Weed Science, 48:481-486.

(10) J. F. H. Cole og L. Canning (1993), Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants, BCPC — Weeds, s. 151-156.

(11) M. Fiely (Ernst Conservation Seeds) (2004), personlig samtale (www.ernstseed.com).

(12) J. S. Fletcher, F. L. Johnson og J. C. McFarlane (1990), Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment, Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) J. S. Fletcher, T. G. Pfleeger, H. C. Ratsch og R. Hayes (1996), Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants, Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) S. Flynn, R. M. Turner og J. B. Dickie (2004), Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004), Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid).

(15) J. Franzaring, C. Kempenaar og L. J. M. van der Eerden (2001), Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species, Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) H. A. Gleason og A. Cronquist (1991), Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed., New York Botanical Garden, Bronx, NY, USA.

(17) J. P. Grime (1981), The role of seed dormancy in vegetation dynamics, Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) J. P. Grime, G. Mason, A. V. Curtis, J. Rodman, S. R. Band, M. A. G. Mowforth, A. M. Neal og S. Shaw (1981), A comparative study of germination characteristics in a local flora, Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) J. P. Grime, J. G. Hodgson og R. Hunt (1988), Comparative plant ecology: a functional approach to common British species, Unwin Hyman Ltd., London.

(20) C. Kjær (1994), Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.), Weed Research, 34:453-459.

(21) T. E. Klingaman, C. A. King og L. R. Oliver (1992), Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity, Weed Science, 40:227-232.

(22) R. H. Marrs, C. T. Williams, A. J. Frost og R. A. Plant 1989, Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest, Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) R. H. Marrs, A. J. Frost og R. A. Plant (1991), Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure, Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) R. H. Marrs, A. J. Frost og R. A. Plant (1991), Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms, Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) R. H. Marrs, A. J. Frost, R. A. Plant og P. Lunnis (1993), Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift, Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) R. H. Marrs og A. J. Frost (1997), A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities, Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) E. J. P. Marshall og J. E. Bernie (1985), Herbicide effects on field margin flora, BCPC — Weeds, s. 1021-1028.

(28) R. A. McKelvey, J. P. Wright og J. L. Honegger (2002), A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing, Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) S. Morton (Herbiseed) (2004), personlig samtale (http://www.herbiseed.com).

(30) USDA, NRCS (2004), The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov), National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

(31) USEPA (1999), One-Liner Database, [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) R. H. Webster (1979), Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes, Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford, England.

(33) A. L. White og C. Boutin (National Wildlife Research Centre, Environment Canada) (2004), personlig samtale.

(34) P. Zwerger og W. Pestemer (2000), Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test, Z. PflKrankh, PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Tillæg 4

Eksempler på passende vækstbetingelser for visse plantearter

Følgende betingelser har vist sig egnet til ti plantearter og kan bruges som retningslinjer for test i vækstkamre — også med visse andre arter:

Kuldioxidkoncentration: 350 ± 50 ppm

Relativ fugtighed: 70 ± 5 % i lyse perioder og 90 ± 5 % i mørke perioder

Temperatur: 25 °C ± 3 °C om dagen, 20 °C ± 3 °C om natten

Lysperiode: 16 timers lys/8 timers mørke, idet der forudsættes en gennemsnitlig bølgelængde på 400-700 nm

Lys: lysstyrke på 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, målt øverst i kammeret.

Plantearterne er følgende:

— tomat (*Solanum lycopersicon*)

— agurk (*Cucumis sativus*)

— havesalat (*Lactuca sativa*)

— sojabønne (*Glycine max*)

— hvidkål (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

— gulerod (*Daucus carota*)

— almindelig havre (*Avena sativa*)

— almindeligt rajgræs (*Lolium perenne* L.)

— majs (*Zea mays*)

— løg (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. FORMERINGSTEST — ENCHYTRAEIDER

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 220 (2004). Den er beregnet til vurdering af kemikaliers virkninger på reproduktionen hos enchytraeider, Enchytraeus albidus Henle 1873, i jord. Den er hovedsagelig baseret på en metode, der er udviklet af Umweltbundesamt, Tyskland (1), og som er blevet ringtestet (2). Andre metoder til testning af kemikaliers toksicitet for enchytraeider og regnorme er også taget i betragtning (3)(4)(5)(6)(7)(8).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Jordboende annelider af slægten Enchytraeus er økologisk relevante arter til økotoksikologisk testning. Enchytraeider forekommer ganske vist ofte i jord med regnorme, men de er også ofte hyppigt forekommende i jord uden regnorme. Enchytraeider kan både bruges i laboratorietest og i tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg. Fra et praktisk synspunkt er mange Enchytraeus-arter lette at håndtere og avle, og deres generationstid er betydeligt kortere end regnormens. Varigheden af en formeringstest med enchytraeider er derfor kun 4-6 uger, mens den for regnorme (Eisenia fetida) er otte uger.

3. Grundlæggende oplysninger om enchytraeiders økologi og økotoksikologi i jordmiljøet kan findes i (9)(10)(11)(12).

PRINCIP FOR TESTEN

4. Voksne enchytraeider udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet blandet i syntetisk jord. Testen kan inddeles i to trin: a) en test til bestemmelse af dosisinterval, såfremt der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger, hvori dødeligheden er det primære endepunkt, der vurderes efter to ugers eksponering, og b) en endelig formeringstest, hvor forældredyrets samlede antal unger og forældredyrets overlevelse vurderes. Den endelige tests varighed er seks uger. Efter de første tre uger fjernes de voksne orme, og morfologiske ændringer registreres. Efter yderligere tre uger tælles ungerne, der klækkes af de kokoner, de voksne orme har frembragt. Reproduktionen for de dyr, der blev eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med reproduktionen for kontrollen/kontrollerne for at fastlægge i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) EC_x (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) ved at bruge en regressionsmodel til at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage x % reduktion i reproduktionen. EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker (f.eks. EC_{10}, EC_{50}), således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

5. Testkemikaliets vandopløselighed, log K_{ow}, fordelingskoefficient mellem jord og vand (f.eks. kapitel C.18 eller C.19 i dette bilag) og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord, såsom fotolyse- og hydrolysehastighed, er ønskelige.

6. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilførselsmåden for testkemikaliet variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-/vandfordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

▼M6

TESTENS VALIDITET

7. Hvis en test skal være valid, skal følgende resultatkrav opfyldes af kontrollerne:

— Dødeligheden blandt voksne orme må ikke overstige 20 % ved afslutningen af testen til bestemmelse af dosisinterval og efter de første tre uger af formeringstesten.

— Under forudsætning af at der blev brugt ti voksne orme pr. beholder ved opstilling af testen, skal der gennemsnitligt mindst være frembragt 25 unger pr. beholder ved testens afslutning.

— Variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal unger må ikke overstige 50 % ved formeringstestens afslutning.

Hvis en test ikke opfylder ovenstående validitetskriterier, skal den afsluttes, medmindre der kan fremlægges en begrundelse for at fortsætte testen. Begrundelsen skal fremgå af testrapporten.

REFERENCEKEMIKALIE

8. Et referencekemikalie bør enten testes med jævne mellemrum eller eventuelt indgå i hver test, for at kontrollere at testorganismernes respons ikke har ændret sig signifikant over tid. Et egnet referencekemikalie er carbendazim, som har vist sig at påvirke enchytraeiders overlevelse og formeringsevne (13)(14), men der kan også anvendes andre kemikalier, hvis toksicitetsdata er velkendte. En formulering af carbendazim, som er kendt under handelsnavnet Derosal™, og som leveres af AgrEvo Company (Frankfurt, Tyskland) og indeholder 360 g/l (32,18 %) aktiv bestanddel, blev brugt i en ringtest (2). Den EC_{50}-værdi for formering, der blev bestemt i ringtesten, lå i området 1,2 ± 0,8 mg aktiv bestanddel/kg tørmasse (2). Hvis en positiv toksisk standard er inkluderet i testserien, anvendes der en koncentration, og antallet af replikater skal være det samme som i kontrollerne. Hvis der anvendes carbendazim, anbefales test af 1,2 mg aktivt stof/kg tørvægt (testet som en flydende formulering).

BESKRIVELSE AF TESTEN

Udstyr

9. Testbeholderne skal være udført helt i glas eller et andet kemisk inert materiale. Glas (f.eks. volumen: 0,20-0,25 liter; diameter: ≈ 6 cm) er egnede. Beholderne bør have gennemsigtige låg (f.eks. glas eller polyethylen), der er designet til at reducere vandfordampning, samtidig med at der kan ske en gasudveksling mellem jord og atmosfære. Lågene bør være gennemsigtige for at sikre lysgennemtrængelighed.

10. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:

— tørreskab

— stereomikroskop

— pH-meter og fotometer

— egnede nøjagtige vægte

— passende udstyr til temperaturkontrol

— passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne har låg)

— inkubator eller lille rum med klimaanlæg

— pincetter, kroge eller spiraler

— fremkalderkar.

Klargøring af den syntetiske jord

11. Den syntetiske jord, der bruges i testen (5)(7), har følgende sammensætning (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):

▼**M6**

— 10 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel); det anbefales at kontrollere, at jord klargjort med et frisk parti sphagnum er egnet til dyrkning af ormene, inden den bruges i en test

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

— ca. 0,3-1,0 % calciumcarbonat ($CaCO_3$, pulveriseret, analysekvalitet) for at få en pH på 6,0 ± 0,5. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art

— ca. 70 % lufttørret kvartssand (afhængigt af den nødvendige mængde $CaCO_3$), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm.

Det anbefales at påvise egnetheden af syntetisk jord til at dyrke ormene og til at opfylde testvaliditetskriterierne, før jorden anvendes i en endelig test. Det anbefales især at foretage en sådan kontrol, for at sikre at udførelsen af testen ikke kompromitteres, hvis den syntetiske jords organiske kulstofindhold reduceres, f.eks. ved at sænke sphagnumindholdet til 4-5 % og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliet adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for ormene forøges. Det er blevet påvist, at Enchytraeus albidus kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold end det nævnte (f.eks. 2,7 %) (15), og erfaringer — omend begrænsede — viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv.

Bemærk: Når der bruges naturlig jord i supplerende test (f.eks. på efterfølgende trin), skal det også dokumenteres, at jorden er egnet, og at validitetskriterierne er opfyldt.

12. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblander). Dette gøres, mindst en uge inden testen påbegyndes. Den blandede jord opbevares i to dage for at ækvilibrere den/stabilisere surhedsgraden. Til bestemmelse af pH anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid ($CaCl_2$) i forholdet 1:5 (se (16) og tillæg 3). Hvis jorden er mere syreholdig end det krævede område (se punkt 11), kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde $CaCO_3$. Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af mere af blandingen i henhold til punkt 11, men uden $CaCO_3$.

13. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2. En eller to dage før testens start fugtes den tørre syntetiske jord på forhånd ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Ved testens start opdeles den fugtede jord i portioner svarende til antallet af testkoncentrationer (og eventuelt referencekemikalie) og kontroller, der benyttes til testen. Vandindholdet justeres til 40-60 % af den maksimale vandholdende

▼M6

evne ved tilsætning af testkemikalieopløsningen og/eller ved tilsætning af destilleret eller deioniseret vand (se punkt 19-21). Vandindholdet bestemmes ved testens begyndelse og slutning (ved tørring til konstant vægt ved 105 °C) og skal ligge inden for det optimale område for ormenes overlevelse. Jordens vandindhold kan bestemmes omtrentlig ved forsigtigt at presse jorden i hånden. Hvis vandindholdet er korrekt, viser små vanddråber sig mellem fingrene.

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

14. Den anbefalede testart er Enchytraeus albidus Henle 1837 (hvid kompostorm), som tilhører familien Enchytraeidae (orden: Oligochaeta, række: Annelida). E. albidus er en af de største arter af enchytraeider, og der er registreret individer på op til 35 mm i længden (17)(18). E. albidus findes i hele verden på marine, limniske og terrestriske levesteder, primært i organiske materialer under nedbrydning (tang og kompost) og sjældent i engområder (9). Dens brede økologiske tolerance og visse morfologiske variationer kan tyde på, at arten omfatter forskellige racer.

15. Enchytraeus albidus sælges som fiskefoder. Det bør undersøges, om bestanden er kontamineret af andre, normalt mindre arter (1)(19). Hvis kontaminering forekommer, bør alle orme skylles med vand i en petriskål. Store voksne individer af Enchytraeus albidus udvælges derefter (ved hjælp af et stereomikroskop) for at starte en ny bestand. Alle andre orme kasseres. E. albidus kan let dyrkes i en lang række organiske materialer (se tillæg 4). Ormens livscyklus er kort, da den når sin modenhed mellem 33 dage (ved 18 °C) og 74 dage (ved 12 °C) (1). Kun bestande, der har været i laboratoriet i mindst fem uger (en generation) uden problemer, bør anvendes i en test.

16. Andre arter af Enchytraeus-slægten kan også anvendes, f.eks. E. buchholzi Vejdovsky 1879 eller E. crypticus Westheide & Graefe 1992 (se tillæg 5). Hvis andre arter af Enchytraeus anvendes, skal de identificeres klart, og begrundelsen for valget af art skal anføres i rapporten.

17. De dyr, der bruges til test, er voksne orme. De skal have æg (hvide pletter) i bælteområdet, og de skal have omtrent samme størrelse (ca. 1 cm i længden). Synkronisering af dyrkningskulturen er ikke nødvendig.

18. Hvis enchytraeiderne ikke dyrkes i den samme jordtype og under samme betingelser (herunder fodring) som for den endelige test, skal de akklimatiseres i mindst 24 timer og op til tre dage. Et større antal voksne individer end det, der er nødvendigt for udførelsen af testen, akklimatiseres for at give mulighed for afvisning af skadede individer eller individer, der er uegnede af andre årsager. Ved afslutningen af akklimatiseringsperioden udvælges kun orme med æg, som ikke udviser unormal adfærd (f.eks. forsøger at slippe væk fra jorden), til testen. Ormene udtages omhyggeligt med pincet, krog eller spiral og anbringes i en petriskål, der indeholder en lille mængde ferskvand. Kunstigt fremstillet ferskvand, jf. kapitel C.20 i dette bilag (Daphnia magna formeringstest), foretrækkes til dette formål, eftersom deioniseret eller demineraliseret vand eller ledningsvand kan være skadeligt for ormene. Ormene undersøges i et stereomikroskop, og eventuelle orme uden æg frasorteres. Eventuelle mider eller springhaler, der måtte have inficeret kulturerne, frasorteres omhyggeligt. Sunde orme, der ikke bruges til testen, returneres til stamkulturen.

▼M6

Klargøring af testkoncentrationer

Vandopløseligt testkemikalie

19. En opløsning af testkemikaliet klargøres i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Det anbefales at bruge en passende mængde vand for at opnå det nødvendige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (se punkt 13). Hver opløsning af testkemikaliet blandes grundigt med et parti forhåndsfugtet jord, før det tilsættes til testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliet opløses i det mindst mulige volumen af et egnet bærestof (f.eks. acetone). Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Bærestoffet sprøjtes på eller blandes med en lille mængde, f.eks. 2,5 g, fint kvartssand. Bærestoffet fjernes ved afdampning i et stinkskab i mindst en time. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding overføres til testbeholderne.

21. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes 2,5 g fintformalet kvartssand pr. testbeholder med testkemikaliet for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en passende kontrolgruppe.

22. Kemikalier bør normalt ikke testes ved koncentrationer på over 1 000 mg/kg tørmasse jord. Det kan dog i overensstemmelse med en specifik tests mål være nødvendigt at teste ved højere koncentrationer.

UDFØRELSE AF TESTEN

Testgrupper og kontrolgrupper

23. For hver testkoncentration anbringes en mængde testjord svarende til 20 g tørvægt i testbeholderen (se punkt 19-20). Kontroller uden testkemikaliet klargøres også. Hver beholder tilsættes foder i overensstemmelse med fremgangsmåden i punkt 29. Ormene fordeles vilkårligt, således at der er ti i hver testbeholder. Ormene overføres forsigtigt til hver testbeholder og placeres på jordoverfladen ved hjælp af f.eks. en pincet, en krog eller en spiral. Antallet af replikater for testkoncentrationer og for kontroller afhænger af det anvendte testdesign (se punkt 34). Testbeholderne placeres vilkårligt i testinkubatoren, og disse placeringer randomiseres på ny en gang om ugen.

24. Hvis der bruges et bærestof til tilførsel af testkemikaliet, testes en kontrolserie indeholdende kvartssand påsprøjtet eller iblandet opløsningsmidlet ud over testserierne. Koncentrationen med opløsnings- eller dispergeringsmiddel skal være den samme som den, der bruges i testbeholderne med testkemikaliet. En kontrolserie indeholdende kvartssand (2,5 g pr. beholder) bør testes for kemikalier, der kræver administration i overensstemmelse med fremgangsmåden i punkt 21.

▼M6

Testbetingelser

25. Testtemperaturen er 20 °C ± 2 °C. For at sikre at ormene ikke forlader jorden, udføres testen under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 16 timers lys og 8 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholdernes område.

26. For at kontrollere jordfugtigheden vejes beholderne i begyndelsen af testen og efterfølgende en gang om ugen. Vægttab erstattes ved tilsætning af en passende mængde deioniseret vand. Det skal bemærkes, at vandtabet kan reduceres ved at opretholde en høj luftfugtighed (> 80 %) i testinkubatoren.

27. Fugtindholdet og pH måles i begyndelsen og slutningen af både den indledende test og den endelige test. Målinger foretages i kontrollen og behandlede (alle koncentrationer) jordprøver, der er klargjort og opbevaret på samme måde som testkulturerne, men uden orme. Foder tilsættes kun til disse jordprøver i begyndelsen af testen for at fremme mikrobiel aktivitet. Den tilsatte mængde foder skal være den samme som den, der tilsættes til testkulturerne. Det er ikke nødvendigt at tilsætte yderligere foder til beholderne under testen.

Fodring

28. Der kan bruges foder, som er i stand til at opretholde populationen af enchytraeider. Valsede havregryn, om muligt autoklaveret inden brug for at forebygge mikrobiel kontaminering (opvarmning er også hensigtsmæssig), har vist sig at være egnet foder.

29. Foder gives først ved at blande 50 mg formalede valsede havregryn i jorden i hver beholder, inden ormene tilsættes. Derefter tilsættes der foder ugentligt frem til dag 21. Der tilsættes ikke foder på dag 28, da de voksne individer er blevet fjernet på dette trin, og deres afkom har brug for forholdsvis lidt supplerende foder efter dette tidspunkt. Fodring under testen omfatter 25 mg formalede valsede havregryn pr. beholder, som forsigtigt anbringes på jordoverfladen for at undgå at skade ormene. For at undgå svampevækst skal havreflagerne begraves i jorden ved at dække dem med små mængder jord. Hvis foder ikke bliver spist, skal rationen reduceres.

Design af testen til bestemmelse af dosisinterval

30. Når det er nødvendigt, udføres der en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg (tørvægt af jord). En replikat pr. behandling og kontrol er tilstrækkelig.

31. Varigheden af den indledende test er to uger. Ved afslutningen af testen vurderes dødeligheden for ormene. En orm registreres som død, hvis den ikke reagerer på en mekanisk påvirkning af bagenden. Andre oplysninger end dødelighed kan også være afgørende for fastlæggelsen af koncentrationsområdet i den endelige test. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres derfor også sammen med tilstedeværelsen af eventuelt afkom. Sidstnævnte kan bestemmes ved anvendelse af farvningsfremgangsmåden i tillæg 6.

32. LC_{50} kan bestemmes omtrentligt ved at beregne det geometriske gennemsnit af dødelighedsdataene. Ved fastlæggelsen af koncentrationsområdet for den endelige test antages virkningerne på reproduktionen at være lavere end LC_{50} med højst en faktor 10. Der er dog tale om en empirisk sammenhæng,

▼M6

som ikke nødvendigvis er den samme i alle specifikke tilfælde. Yderligere observationer foretaget i den indledende test, såsom forekomsten af afkom, kan bidrage til at præcisere det koncentrationsområde for testkemikaliet, der skal bruges til den endelige test.

33. Med henblik på nøjagtig bestemmelse af LC_{50} anbefales det at udføre testen med mindst fire replikater af hver af testkemikaliekoncentrationerne og et tilstrækkeligt antal koncentrationer til at give mindst fire statistisk signifikante forskellige gennemsnitsresponser ved disse koncentrationer. Der bruges et tilsvarende antal koncentrationer og replikater til eventuelle kontroller.

Design af den endelige formeringstest

34. Der foreslås tre design på grundlag af anbefalingerne som følge af en ringtest (2):

— For at fastlægge NOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

— For at bestemme EC_x (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) skal der testes mindst fem koncentrationer, og EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation. Der anbefales mindst fire replikater for hver testkoncentration og fire kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.

— En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og EC_x. Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

35. Der bruges ti voksne orme pr. testbeholder (se punkt 23). Foder tilsættes ved begyndelsen af testen og herefter en gang om ugen (se punkt 29) frem til og med dag 21. På dag 21 undersøges jordprøverne omhyggeligt med hænderne, levende voksne orme observeres og tælles, og ændringer i adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres. Alle voksne orme fjernes derefter fra testbeholderne og testjorden. Testjord, der indeholder eventuelle kokoner, der måtte være frembragt, inkuberes i yderligere tre uger under samme testbetingelser, bortset fra at fodring kun finder sted på dag 35 (25 mg formalede valsede havregryn pr. beholder).

36. Efter seks uger tælles de nyudklækkede orme. Denne metode, som er baseret på Rose Bengal-farvning (se tillæg 6), anbefales, men andre vådekstrations- og vådflotationsteknikker (uden varme) (se tillæg 6) har også vist sig at være egnede (4)(10)(11)(20). Bengal Rose-farvning anbefales, fordi vådekstraktion fra et jordsubstrat kan hæmmes af turbiditet forårsaget af opslæmmede lerpartikler.

Grænsetest

37. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til bestemmelse af dosisinterval (dvs. 1 000 mg/kg), kan formeringstesten udføres som en grænsetest med 1 000 mg/kg, for at påvise at NOEC for formering er større end denne værdi.

▼M6

Resume og tidsplan for testen

38. De enkelte trin i testen kan opsummeres som følger:

Tidspunkt	Test til bestemmelse af dosisinterval	Endelig test
Dag – 7 eller tidligere	— Klargør syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele)	— Klargør syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele)
Dag – 5	— Kontroller den syntetiske jords pH — Mål jordens maksimale vandholdende evne	— Kontroller den syntetiske jords pH — Mål jordens maksimale vandholdende evne
Dag – 5 til – 3	— Sorter orme med henblik på akklimatisering	— Sorter orme med henblik på akklimatisering
Dag – 3 til 0	— Akklimatiser orme i mindst 24 timer	— Akklimatiser orme i mindst 24 timer
Dag – 1	— Fugt den syntetiske jord, og fordel den i partier	— Fugt den syntetiske jord, og fordel den i partier
Dag 0	— Klargør stamopløsninger — Tilsæt testkemikalie — Afvej testsubstrat i testbeholdere — Ibland foder — Tilsæt orme — Mål jordens pH og fugtindhold	— Klargør stamopløsninger — Tilsæt testkemikalie — Afvej testsubstrat i testbeholdere — Ibland foder — Tilsæt orme — Mål jordens pH og fugtindhold
Dag 7	— Kontroller jordens fugtindhold	— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 14	— Bestem dødelighed for voksne individer — Bestem antal unger — Mål jordens pH og fugtindhold	— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 21		— Observer de voksne individers adfærd — Fjern voksne individer — Bestem dødelighed for voksne individer — Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 28		— Kontroller jordens fugtindhold — Ingen fodring
Dag 35		— Kontroller jordens fugtindhold — Fodr ormene
Dag 42		— Tæl unger — Mål jordens pH og fugtindhold

▼M6

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

39. Tillæg 7 indeholder en oversigt, men testmetoden giver ingen endelig statistisk vejledning i analyse af testresultaterne.

40. I testen til bestemmelse af dosisinterval er det primære endepunkt dødelighed. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres dog også sammen med tilstedeværelsen af eventuelle unger. Der bruges normalt probabilistisk analyse (21) eller logistisk regression til at bestemme LC_{50}. I tilfælde hvor denne analysemetode er uegnet (f.eks. hvis der er færre end tre koncentrationer med delvis dødelighed) kan der bruges alternative metoder. Disse metoder kan omfatte glidende gennemsnit (22), Trimmed Spearman-Karber-metoden (23) eller simpel interpolation (f.eks. geometrisk gennemsnit af LC_0 og LC_{100} som beregnet ved kvadratroden af LC_0 ganget med LC_{100}).

41. I den endelige test er endepunktet for testen frugtbarhed (dvs. antal unger). Som i testen til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade dog anføres i den endelige rapport. I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit og standardafvigelsen pr. behandling og pr. kontrol for at beregne reproduktionen.

42. Hvis der er foretaget en variansanalyse, kan standardafvigelsen, s, og frihedsgraderne, df, erstattes af henholdsvis det samlede variansestimat fra variansanalysen og frihedsgraderne herfra — forudsat at variansen ikke afhænger af koncentrationen. I dette tilfælde bruges kontrollernes og behandlingernes individuelle varianser. Disse værdier beregnes normalt med kommerciel statistisk software, der bruger resultater pr. beholder som replikater. Hvis det skønnes mere hensigtsmæssigt at samle data for de negative kontroller og opløsningsmiddelkontrollerne end at teste dem hver for sig, skal de testes, for at konstatere at de ikke er signifikant forskellige (punkt 45 og tillæg 7 indeholder beskrivelser af egnede test).

43. Yderligere statistisk testning og følgeslutning afhænger af, hvorvidt replikatværdierne er normalt fordelt og er homogene med hensyn til varians.

Beregning af NOEC

44. Anvendelse af stærke statistiske test foretrækkes. Der bør bruges oplysninger fra f.eks. tidligere erfaring med ringtest eller andre historiske oplysninger om, hvorvidt data er nogenlunde normalt fordelt. Varianshomogenitet (homoskedasitet) er mere afgørende. Erfaringer viser, at variansen ofte stiger med stigende gennemsnit. I disse tilfælde kan transformation af data medføre homoskedasitet. En sådan transformation bør dog være baseret på erfaring med historiske data snarere end på data, der undersøges. Med homogene data udføres flere t-test, såsom Williams' test ($\alpha = 0{,}05$, ensidet) (24)(25) eller i visse tilfælde Dunnetts test (26)(27). Det skal bemærkes, at t-værdierne i tabellen — i tilfælde af ulige replikation — skal korrigeres i henhold til Dunnett og Williams. Nogle gange stiger/falder responserne ikke regelmæssigt på grund af stor variation. I dette tilfælde, hvor der er tale om en kraftig afvigelse fra monotoni, er Dunnetts test mere velegnet. Hvis der er afvigelser fra homoskedasitet, kan det være fornuftigt at undersøge mulige virkninger på varians nærmere, for at beslutte om der kan bruges

▼M6

t-test uden at miste betydelig styrke (28). Alternativt kan der bruges flere U-test, f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm (29), eller når dataene udviser heteroskedasticitet, men ellers svarer til et underliggende monotont dosis/respons-forhold, en anden ikke-parametrisk test [f.eks. Jonckheere-Terpstra (30)(31) eller Shirley (32)(33)], som generelt ville være at foretrække frem for t-test justeret for forskel i varians (se også figuren i tillæg 7).

45. Er der udført en grænsetest, og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan den parvise Student-t-test bruges eller alternativt Mann-Whitney-U-testen (29).

Beregning af EC_x

46. For at beregne enhver EC_x-værdi bruges middelværdierne pr. behandling til regressionsanalyse (lineær eller ikke-lineær), når der er opnået et passende dosis/respons-forhold. For ormenes vækst som en kontinuerlig respons kan ECx-værdier estimeres ved hjælp af passende regressionsanalyse (35). Blandt egnede forhold for kvantale data (dødelighed/overlevelse) og afkom er normale sigmoidforhold, logistiske forhold eller Weibull-forhold, som omfatter to til fire parametre, hvoraf nogle også kan modellere hormetiske responser. Hvis et dosis/respons-forhold blev bestemt ved lineær regressionsanalyse, bør en signifikant r^2 (determinationskoefficient) og/eller hældning findes ved regressionsanalyse, inden EC_x bestemmes ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den ligning, der er fundet ved regressionsanalyse. 95 % konfidensgrænser beregnes ifølge Fieller (nævnt i Finney (21)) eller andre moderne passende metoder.

47. Alternativt modelleres responsen som en procentdel eller andel af modelparametre, hvilket fortolkes som kontrollernes gennemsnitsrespons. I disse tilfælde kan den normale (logistiske, Weibull-) sigmoidkurve ofte let tilpasses til resultaterne ved hjælp af den probabilistiske regressionsmetode (21). I disse tilfælde skal vægtningsfunktionen justeres for metrisk respons, jf. Christensen (36). Hvis der er konstateret hormese, bør den probabilistiske analyse erstattes af en logistisk funktion med fire parametre eller Weibull-funktion tilpasset med den ikke-lineære regressionsmetode (36). Hvis et passende dosis/respons-forhold ikke kan tilpasses til dataene, kan der bruges andre metoder til at bestemme EC_x, og værdiens konfidensgrænser, f.eks. glidende gennemsnit i henhold til Thompson (22) og Trimmed Spearman-Karber-metoden (23).

TESTRAPPORT

48. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber og, når det er relevant, relevante fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. opløselighed i vand, damptryk)

— kemisk identifikation af testkemikaliet ifølge IUPAC-nomenklaturen, CAS-nummer, parti, batch, strukturformel og renhed

— prøvens udløbsdato.

Testede arter:

— anvendte testdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser.

Testbetingelser:

— bestanddele og klargøring af den syntetiske jord

▼M6

— tilsætningsmetode for testkemikaliet

— beskrivelse af testbetingelserne, herunder temperatur, fugtindhold, pH osv.

— fuldstændig beskrivelse af forsøgsdesign og fremgangsmåder.

Testresultater:

— dødelighed for voksne orme efter to uger og antal unger ved afslutningen af testen til bestemmelse af dosisinterval

— dødelighed for voksne orme efter tre ugers eksponering og fuld fortegnelse over afkom ved afslutningen af den endelige test

— eventuelle observerede fysiske eller patologiske symptomer og adfærdsændringer hos testorganismerne

— LC_{50}, NOEC og/eller EC_x (f.eks. EC_{50}, EC_{10}) for formering, hvis nogle af værdierne er udtrykt med konfidensintervaller, og en graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning heraf, samt alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

Afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

(1) J. Römbke (1989), Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen, Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) J. Römbke og T. Moser (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99, s. 150 + s. 223 ff.

(3) W. Westheide og D. Bethge-Beilfuss (1991), The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, in: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects, Ed.: G. Esser og D. Overdieck, s. 497-508. Amsterdam Elsevier,

(4) E. Dirven-Van Breemen, R. Baerselmann og J. Notenboom (1994), Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek, RIVM Rapport Nr. 719102025. s. 46 ff.

(5) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(6) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1, ISO, Genève.

(7) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.

(8) S. Rundgren og A. K. Augustsson (1998), Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877), in: H. Løkke og C. A. M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests, John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) K. Kasprzak (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, Pedobiologia 23, 217-232.

(10) J. Römbke (1995), Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 7, 246-249.

(11) W. Dunger og H. J. Fiedler (1997), Methoden der Bodenbiologie, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) W. A. M. Didden (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, Pedobiologia 37, 2-29.

(13) H. Becker (1991), Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung, UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 3, 19-24.

(14) J. Römbke og A. Federschmidt (1995), Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) J. Römbke, F. Riepert og R. Achazi (2000), Enchytraeen als Testorganismen, in: Toxikologische Beurteilung von Böden. S. Heiden, R. Erb, W. Dott og A. Eisentraeger (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

(17) A. W. Bell (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*, Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) C. O. Nielsen og B. Christensen (1959), The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species, Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) V. Bouguenec og N. Giani (1987), Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*, Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) J. Korinkova og J. Sigmund (1968), The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) D. J. Finney (1971), Probit Analysis (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.

(22) D. J. Finney (1978), Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

(25) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

(26) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) C. W. Dunnett (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control, Biometrics 20, 482-491.

(28) N. van der Hoeven (1998), Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?, Ecotoxicology 7: 355-361.

(29) S. Holm (1979), A simple sequentially rejective multiple test procedure, Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) A. R. Jonckheere (1954), A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) T. J. Terpstra (1952), The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) E. A. Shirley (1979), The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) D. A. Williams (1986), A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research, 2nd edition. W. H. Freeman and Company, New York.

(35) E. R. Christensen (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18, 213-221.

(36) P. H. Van Ewijk og J. A. Hoekstra (1993), Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present, Ecotox, Environ. Safety 25, 25-32.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

EC_x (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. I denne test udtrykkes effektkoncentrationerne som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC_0 (ikke-dødelig koncentration) er den koncentration af et testkemikalie, der ikke dræber nogen af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_0 som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC_{50} (dødelig koncentration 50 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 50 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_{50} som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC_{100} (dødelig koncentration 100 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 100 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_{100} som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrollen har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$). I denne test udtrykkes LOEC som en masse testkemikalie pr. tørmasse testjord. Alle testkoncentrationer over LOEC bør normalt udvise en effekt, der er statistisk forskellig fra kontrollen. Eventuelle afvigelser fra ovenstående i forbindelse med identifikation af LOEC skal begrundes i testrapporten.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den højeste testkemikaliekoncentration umiddelbart under LOEC, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Reproduktionsrate er det gennemsnitlige antal unger, der er produceret pr. antal voksne individer i løbet af testperioden.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

Bestemmelse af den maksimale vandholdende evne

Bestemmelse af den syntetiske jords vandholdende evne

Følgende metode har vist sig at være hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2.

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet anordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, og røret placeres herefter — efter påfyldning af vand — på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintformalet kvartssand i en lukket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

KILDER:

ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.

▼**M6**

Tillæg 3

Bestemmelse af jordens pH

Følgende metode til bestemmelse af en jordprøves pH er baseret på beskrivelsen i ISO 10390 (Soil Quality — Determination of pH).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sin mængde af enten 1 M kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid ($CaCl_2$) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes derefter grundigt i fem minutter. Efter omrystning henstår suspensionen i mindst to timer, men ikke over 24 timer. Væskefasens pH måles herefter ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

KILDER:

ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

▼**M6**

Tillæg 4

Dyrkningsbetingelser for *Enchytraeus Sp.*

Enchytraeider af arten Enchytraeus albidus (og andre Enchytraeus-arter) kan dyrkes i store plastkasser (f.eks. 30 × 60 × 10 cm) fyldt med en 1:1 blanding af syntetisk jord og naturlig, uforurenet havejord. Kompostmateriale skal undgås, da det kan indeholde toksiske kemikalier, f.eks. tungmetaller. Fauna fjernes fra jorden inden brug (f.eks. ved dybfrysning). Et substrat, som udelukkende består af syntetisk jord, kan også bruges, men reproduktionen kan være lavere end den, der opnås med blandet jordsubstrat. Det substrat, der bruges til dyrkning, skal have en pH på 6,0 ± 0,5.

Kulturen opbevares i mørke ved en temperatur på 15-20 °C ± 2 °C. Temperaturer på over 23 °C skal undgås. Jorden bør være fugtig, men ikke våd. Det korrekte fugtindhold i jorden er opnået, når små vanddråber viser sig mellem fingrene, når jorden presses forsigtigt sammen. Iltfattige betingelser skal undgås, ved at sikre at låg på dyrkningsbeholdere tillader passende gasudveksling med atmosfæren. Jorden skal brydes omhyggeligt hver uge for at fremme beluftning.

Ormene kan fodres med valsede havregryn. Havregrynene opbevares i lukkede beholdere og autoklaveres eller opvarmes inden brug for at undgå infektion med melmider (f.eks. Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina) eller rovmider (f.eks. Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina). Efter varmebehandling formales foderet, så det nemt kan strøs ud på jordoverfladen. Fra tid til anden kan de valsede havregryn suppleres med vitaminer, mælk og torskelevertran. Andre egnede foderkilder er bagegær og fiskefoderet »TetraMin«.

Fodring finder sted ca. to gange om ugen. En passende mængde valsede havregryn strøs ud på jordoverfladen eller iblandes omhyggeligt i substratet, når jorden brydes for at fremme beluftning. Den absolutte mængde uddelt foder afhænger af antallet af orme i substratet. Som hovedregel øges mængden af foder, hvis alt foderet er spist inden for en dag efter fodring. Omvendt reduceres mængden af foder, hvis der stadig er foder på overfladen på tidspunktet for den anden fodring (en uge senere). Foder med svampevækst fjernes og erstattes. Efter tre måneder flyttes ormene til et frisk fremstillet substrat.

Dyrkningsbetingelserne anses for tilfredsstillende, hvis ormene: a) ikke forsøger at forlade jordsubstratet, b) bevæger sig hurtigt gennem jorden, c) har en blank overflade uden fastsiddende jordpartikler, d) er mere eller mindre hvide, e) forekommer i forskellige aldre i kulturerne og f) formerer sig løbende.

▼M6

Tillæg 5

Gennemførelse af test med andre *Enchytraeus*-arter

Valg af art

Der kan bruges andre arter end E. albidus, men testmetoden og validitetskriterierne skal tilpasses i overensstemmelse hermed. Eftersom mange Enchytraeus-arter er umiddelbart tilgængelige og let kan holdes i laboratoriet, er det vigtigste kriterium for at vælge andre arter end E. albidus økologisk relevans og desuden sammenlignelig følsomhed. Der kan også være formelle årsager til at skifte art. I lande hvor E. albidus ikke forekommer og ikke kan importeres (f.eks. på grund af karantænemæssige begrænsninger), vil det f.eks. være nødvendigt at bruge en anden Enchytraeus-art.

Eksempler på egnede alternative arter

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide og Graefe 1992): I de senere år er denne art ofte blevet anvendt i økotoksikologiske undersøgelser på grund af ukompliceret formering og testning. Den er dog lille, og det gør den vanskeligere at håndtere end E. albidus (især på trin forud for brug af farvningsfremgangsmåden). Det er ikke med sikkerhed dokumenteret, at E. crypticus findes i det fri, og den er kun blevet beskrevet fra dyrkede regnormebestande. Dens økologiske behov kendes derfor ikke.

— *Enchytraeus buchholzi (Vejdovsky 1879)*: Navnet dækker sandsynligvis over en gruppe nært beslægtede arter, som det er morfologisk vanskeligt at skelne imellem. Det frarådes at bruge denne art til testning, før de individer, der bruges i en test, kan identificeres som arter. E. buchholzi findes sædvanligvis i enge og forstyrrede områder, f.eks. vejkanter.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Denne art var oprindeligt kendt som E. »minutus«, men er for nylig blevet beskrevet (1). Den blev først fundet af U. Graefe (Hamburg) i en eng tæt på St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Tyskland). *E. luxuriosus er ca. halvt så stor som E. albidus, men større end de andre arter, der er beskrevet her; den kan derfor være et godt alternativ til E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen og Christensen 1963): Der har indtil nu været beretninger om denne art i mineraljord i Tyskland og Spanien, hvor den er almindelig, men normalt ikke særligt hyppigt forekommende. Sammenlignet med andre små arter af denne slægt er den forholdsvis let at identificere. Man ved intet om dens adfærd i laboratorietest eller dens følsomhed over for kemikalier. Den har dog vist sig at være let at dyrke (E. Belotti, personlig samtale).

Dyrkningsbetingelser

Alle førnævnte Enchytraeus-arter kan dyrkes i samme substrater som E. albidus. Deres mindre størrelse betyder, at dyrkningsbeholderne kan være mindre, og at der kan bruges samme foder, men at rationsstørrelsen skal justeres. Disse arters livscyklus er kortere end E. albidus' livscyklus, og de skal fodres oftere.

Testbetingelser

Testbetingelserne er generelt de samme som dem, der gælder for E. albidus, bortset fra at:

— testbeholderne kan (men skal ikke nødvendigvis) være mindre

— varigheden af formeringstesten kan (men skal ikke nødvendigvis) være kortere, dvs. fire i stedet for seks uger; varigheden af den indledende test bør dog ikke ændres

— brug af farvningsfremgangsmåden i lyset af ungernes begrænsede størrelse på det kraftigste anbefales til tælling

— kriteriet om »antal unger pr. testbeholder i kontrollen« bør ændres til »50«.

▼**M6**

LITTERATUR

1) R. M. Schmelz og R. Collado (1999), Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida), Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Tillæg 6

Detaljeret beskrivelse af ekstraktionsteknikker

Bengal Rose-farvning

Denne metode, der oprindeligt blev udviklet inden for limnisk økologi (1), blev først foreslået til tælling af unger af enchytraeider i Enchytraeidae-formeringstesten af W. de Coen (Universiteit Gent, Belgien). En ændret version (Bengal Rose blandet med formaldehyd i stedet for ethanol) blev udviklet uafhængigt af RIVM Bilthoven (2)(3).

Ved afslutningen af den endelige test (dvs. efter seks uger) overføres jorden i testbeholderne til en lav beholder. En Bellaplast-beholder eller et fremkalderkar med ribbet bund er velegnet til dette formål, sidstnævnte fordi »ribberne« begrænser ormenes bevægelse i observationsområdet. Ungerne fikseres med ethanol (ca. 5 ml pr. replikat). Beholderne fyldes derefter med vand til et lag på 1-2 cm. Et par dråber (200 til 300 µl) Bengal Rose (1 % opløsning i ethanol) tilsættes (0,5 % eosin er et alternativ), og de to komponenter blandes grundigt. Efter 12 timer får ormene en rødlig farve og bør være nemme at tælle, fordi de ligger på substratets overflade. Alternativt kan substratet/alkoholblandingen skylles gennem en sigte (maskestørrelse: 0,250 mm), inden ormene tælles. Med denne fremgangsmåde vil kaolinit, tørv og noget af sandet blive skyllet ud, og de rødligt farvede orme vil være nemmere at se og tælle. Brugen af linser med lys (linsestørrelse på mindst 100 × 75 mm med en forstørrelsesfaktor på 2 til 3) vil også lette tællingen.

Farvningsteknikken reducerer tælletiden til et par minutter pr. beholder, og som hovedregel skal det være muligt for en person at vurdere alle beholderne fra en test på højst to dage.

Vådekstraktion

Vådekstraktionen bør indledes umiddelbart efter afslutningen af testen. Jorden fra hver testbeholder anbringes i plastsigter med en maskestørrelse på ca. 1 mm. Sigterne ophænges i plastskåle uden at røre bunden. Skålene fyldes forsigtigt op med vand, indtil prøverne i sigterne er helt under vandoverfladen. For at sikre en genfindingsprocent på over 90 % af ormene bør der anvendes en ekstraktionsperiode på tre dage ved 20 °C ± 2 °C. Ved afslutningen af ekstraktionsperioden fjernes sigterne, og vandet (bortset fra en lille mængde) dekanteres langsomt, idet det så vidt muligt undgås at forstyrre sedimentet i bunden af skålene. Plastskålene omrystes derefter let for at suspendere sedimentet i det overliggende vand. Vandet overføres til en petriskål, og når jordpartiklerne er bundfældet, kan enchytraeider identificeres, fjernes og tælles med et stereomikroskop og tænger af blødt stål.

Flotation

En metode baseret på flotation er beskrevet i et notat af R. Kuperman (4). Efter fiksering af indholdet i en testbeholder med ethanol oversvømmes jorden med Ludox (AM-30-siliciumdioxid, 30 vægtprocent suspension i vand) op til 10-15 mm over jordoverfladen. Efter grundig blanding af jorden med flotationsmiddel i 2-3 minutter kan de unger, der flyder på overfladen, let tælles.

Litteratur

(1) J. Korinkova og J. Sigmund (1968), The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) E. Dirven-Van Breemen, R. Baerselmann og J. Notenboom (1994), Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek, RIVM Rapport Nr. 719102025. s. 46 ff.

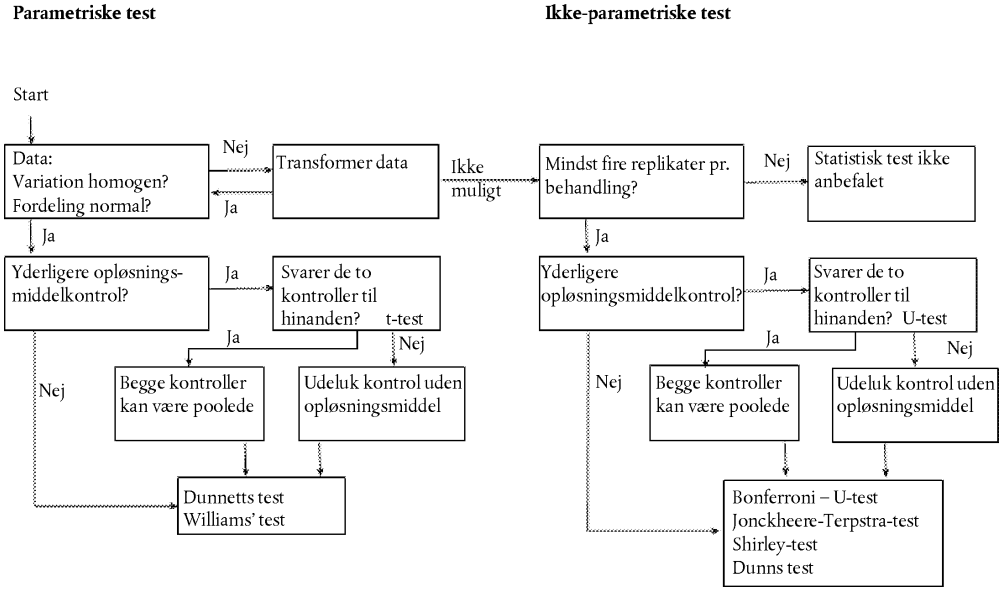
(3) L. Posthuma, R. Baerselmann, R. P. M. Van Veen og E. M. Dirven-Van Breemen (1997), Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils, Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) C. T. Phillips, R. T. Checkai og R. G. Kuperman (1998), An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil, SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA, Abstract Book No. PMP069, s. 157.

▼**M6**

Tillæg 6

Oversigt over den statistiske vurdering af data (bestemmelse af NOEC)



▼M6

C.33. **FORMERINGSTEST (EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 222 (2004). Den er beregnet til vurdering af virkningerne af kemikalier i jorden på reproduktionen (og andre subletale endepunkter) hos regnormearten Eisenia fetida (Savigny 1826) eller Eisenia andrei (Andre 1963) (1)(2). Testen har været genstand for en ringtest (3). Der findes en testmetode for testen for akut toksicitet for regnorme (4). Der er offentliggjort en række andre internationale og nationale vejledninger til test for akut og kronisk toksicitet for regnorme (5)(6)(7)(8).

2. Eisenia fetida/Eisenia andrei betragtes som en repræsentant for jordbundsfauna og især regnorme. Der foreligger baggrundsinformation om regnormes økologi og deres brug i økotoksikologisk testning (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Voksne orme udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet enten blandet i jord eller, når der er tale om pesticider, tilsat i eller på jorden med fremgangsmåder, der stemmer overens med kemikaliets anvendelsesmønster. Tilsætningsmetoden er specifik for testens formål. Testkoncentrationsintervallet vælges, således at det dækker koncentrationer, der sandsynligvis har både subletale og letale virkninger over en periode på otte uger. Dødelighed og vækstvirkninger hos de voksne orme bestemmes efter fire ugers eksponering. De voksne orme fjernes derefter fra jorden, og indvirkningen på reproduktionen vurderes efter yderligere fire uger ved at tælle antallet af unger i jorden. Reproduktionen for de orme, der blev eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med reproduktionen i kontrollen/kontrollerne for at fastlægge i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) EC_x (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) ved at bruge en regressionsmodel til at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage x % reduktion i reproduktionen. EC_x skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker (f.eks. EC_{10}, EC_{50}), således at EC_x opnås ved interpolation og ikke ved ekstrapolation (definitioner er anført i tillæg 1).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Følgende oplysninger om testkemikaliet bør foreligge med henblik på design af passende testprocedurer:

— vandopløselighed

— log K_{ow}

— damptryk

— og om muligt oplysninger om skæbne og adfærd i miljøet (f.eks. fotolyse- og hydrolysehastighed, hvis det er relevant for anvendelsesmønstrene).

5. Denne testmetode kan anvendes på alle kemikalier uanset deres opløselighed i vand. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, der her defineres som kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-/vandfordelingskoefficienten er større end en, eller på kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

6. I denne testmetode tages der ikke hensyn til eventuel nedbrydning af testkemikaliet i løbet af testperioden. Det kan således ikke antages, at eksponeringskoncentrationerne bevarer de oprindelige værdier i hele testen. Det anbefales i givet fald at foretage en kemisk analyse af testkemikaliet ved begyndelsen og afslutningen af testen.

▼M6

REFERENCEKEMIKALIE

7. NOEC og/eller EC_x for et referencekemikalie skal bestemmes, for at give sikkerhed for at laboratorietestbetingelserne er tilstrækkelige og kontrollere, at testorganismernes respons ikke ændrer sig statistisk over tid. Det tilrådes, at testning af et referencekemikalie finder sted mindst en gang årligt eller, når testningsfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie. Carbendazim eller benomyl er egnede referencekemikalier, der har vist sig at påvirke reproduktionen (3). Der skal observeres signifikante effekter ved a) 1-5 mg aktiv bestanddel/kg tørmasse eller b) 250-500 g/ha eller 25-50 mg/m^2. Hvis en positiv toksisk standard er inkluderet i testserien, anvendes der en koncentration, og antallet af replikater skal være det samme som i kontrollerne.

TESTENS VALIDITET

8. Følgende kriterier skal være opfyldt i kontrollerne, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:

— Hver replikat (som indeholder ti voksne individer) skal have frembragt ≥ 30 unger ved afslutningen af testen.

— Variationskoefficienten for reproduktion skal være ≤ 30 %.

— Dødeligheden for voksne individer i testens fire første uger skal være ≤10 %.

Hvis en test ikke opfylder ovenstående validitetskriterier, skal den afsluttes, medmindre der kan fremlægges en begrundelse for at fortsætte testen. Begrundelsen skal fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF TESTEN

Udstyr

9. Der bruges testbeholdere af glas eller et andet kemisk inert materiale med en kapacitet på 1-2 liter. Beholderne skal have et tværsnitsareal på ca. 200 cm^2, således at der opnås en dybde for det fugtige substrat på ca. 5-6 cm, når der tilsættes 500-600 g tørmasse substrat. Beholderens låg skal give mulighed for gasudveksling mellem substratet og atmosfæren og adgang til lys (f.eks. kan låget være perforeret og gennemsigtigt) og samtidig forhindre ormene i at slippe ud. Hvis den anvendte mængde testsubstrat er væsentligt større end 500-600 g pr. testbeholder, skal antallet af orme forøges tilsvarende.

10. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:

— tørreskab

— stereomikroskop

— pH-meter og fotometer

— egnede nøjagtige vægte

— passende udstyr til temperaturkontrol

— passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne har låg)

— inkubator eller lille rum med klimaanlæg

— pincetter, kroge eller spiraler

— vandbad.

▼M6

Klargøring af den syntetiske jord

11. Den syntetiske jord, der bruges i testen (5)(7), har følgende sammensætning (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):

— 10 % sphagnum (så tæt på pH 5,5-6,0 som muligt, uden synlige planterester, findelt og tørret til målt fugtindhold)

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

— 0,3-1,0 % calciumcarbonat ($CaCO_3$, pulveriseret, analysekvalitet) for at opnå en initial pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

— 70 % lufttørret kvartssand (afhængigt af den nødvendige mængde $CaCO_3$), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm.

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde $CaCO_3$ vil afhænge af jordsubstratets komponenter, herunder foder, og bestemmes ved at måle delprøver umiddelbart før testen. pH-værdien måles i en blandet prøve i en 1 M kaliumchloridopløsning (KCl) eller en 0,01 M calciumchloridopløsning ($CaCl_2$) (13).

Bemærkning 2: Jordens organiske kulstofindhold kan reduceres, f.eks. ved at sænke sphagnumindholdet til 4-5 % og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliet adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for ormene forøges. Det er blevet påvist, at Eisenia fetida kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold (f.eks. 2,7 %) (14), og erfaringer viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv. Det er derfor ikke nødvendigt — inden brug af en sådan jord i en endelig test — at påvise egnetheden af den syntetiske jord, for at sikre at testen opfylder validitetskriterierne, medmindre tørvindholdet er lavere end angivet ovenfor.

Bemærkning 3: Når der bruges naturlig jord i supplerende test (f.eks. på efterfølgende trin), skal det også dokumenteres, at jorden er egnet, og at validitetskriterierne er opfyldt.

12. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblander) i et godt ventileret område. Før testens start fugtes den tørre syntetiske jord ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (hvilket svarer til tørmasse med et fugtindhold på 50 ± 10 %). Det giver et substrat uden stående eller frit vand, når det presses sammen i hånden. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2, ISO 11274 (15) eller en tilsvarende EU-standard.

13. Hvis testkemikaliet påføres på jordoverfladen eller blandes i jord uden vand, kan den endelige mængde vand blandes i den syntetiske jord i forbindelse med klargøringen af jorden. Hvis testkemikaliet blandes i jorden sammen med vand, kan yderligere vand tilsættes sammen med testkemikaliet (se punkt 19).

14. Jordens fugtindhold bestemmes ved begyndelsen og afslutningen af testen i overensstemmelse med ISO 11465 (16) eller en tilsvarende EU-standard, og jordens pH bestemmes i overensstemmelse med tillæg 3 eller ISO 10390 (13) eller en tilsvarende EU-standard. Disse bestemmelser bør foretages i en

▼M6

prøve af kontroljord og en prøve af hver type testkoncentrationsjord. Jordens pH bør ikke justeres, når testen vedrører sure eller basiske kemikalier. Fugtindholdet overvåges gennem hele testen ved at veje beholderne regelmæssigt (se punkt 26 og 30).

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

15. Den art, der skal benyttes i testen, er Eisenia fetida eller Eisenia andrei (1)(2). Der skal bruges voksne orme på mellem to måneder og et år med bælte for at begynde testen. Ormene udvælges fra en synkroniseret kultur med en forholdsvis homogen aldersstruktur (tillæg 4). Aldersspredningen blandt individerne i en testgruppe bør ikke være over fire uger.

16. De udvalgte orme akklimatiseres i mindst en dag med den type syntetiske jordsubstrat, der skal anvendes til testen. I denne periode fodres ormene med det samme foder som i testen (se punkt 31-33).

17. Grupper af ti orme vejes enkeltvis, og grupperne fordeles vilkårligt i testbeholderne ved begyndelsen af testen. Ormene vaskes inden vejningen (med deioniseret vand), og det overskydende vand fjernes ved kortvarigt at anbringe ormene på filterpapir. De enkelte ormes vådmasse skal være på 250-600 mg.

Klargøring af testkoncentrationer

18. Der kan benyttes to metoder til tilførsel af testkemikaliet: iblanding af testkemikaliet i jorden (se punkt 19-21) eller påføring på jordoverfladen (se punkt 22-24). Valget af den egnede metode afhænger af formålet med testen. Generelt anbefales det at blande testkemikaliet i jorden. Tilførselsprocedurer, som er i overensstemmelse med normal praksis inden for landbruget, kan dog være påkrævet (f.eks. sprøjtning af flydende formulering eller brug af særlige pesticidformuleringer såsom granulat- eller frøbehandlinger). Opløsningsmidler, der bruges i forbindelse med behandling af jorden med testkemikaliet, udvælges på grundlag af deres lave grad af toksicitet for regnorme, og testen skal omfatte passende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 27).

Iblanding af testkemikaliet i jorden

Vandopløseligt testkemikalie

19. En opløsning af testkemikaliet i deioniseret vand klargøres umiddelbart inden testens begyndelse, i en mængde der er tilstrækkelig til alle replikater af en koncentration. Det kan være nødvendigt med et hjælpeopløsningsmiddel for at lette klargøringen af testopløsningen. Det er hensigtsmæssigt at klargøre den mængde opløsning, der er nødvendig for at opnå det endelige fugtindhold (40-60 % af den maksimale vandholdende evne). Opløsningen blandes omhyggeligt med jordsubstratet, inden det overføres til testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. Testkemikaliet opløses i en lille mængde egnet organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone) og sprøjtes derefter på, eller blandes i, en lille mængde fint kvartssand. Opløsningsmidlet fjernes derefter ved afdampning i et stinkskab i mindst fem minutter. Det behandlede sand blandes derefter omhyggeligt med den forhåndsfugtede syntetiske jord. Derefter tilsættes og iblandes deioniseret vand (den nødvendige mængde) for at opnå et endeligt fugtindhold på 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Jorden er nu klar til anbringelse i testbeholderne. Man bør være opmærksom på, at visse opløsningsmidler kan være toksiske for regnorme.

▼M6

Testkemikalie, der er uopløseligt i vand, og organiske opløsningsmidler

21. En blanding bestående af 10 g fint industrielt kvartssand med den mængde testkemikalie, der er nødvendig for at opnå testkoncentrationen, klargøres. Blandingen blandes derefter omhyggeligt med den forhåndsfugtede syntetiske jord. Derefter tilsættes og iblandes deioniseret vand til den nødvendige mængde for at opnå et endeligt fugtindhold på 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Jorden er nu klar til anbringelse i testbeholderne.

Påføring af testkemikaliet på jordoverfladen

22. Jorden behandles, efter at ormene er tilsat. Testbeholderne fyldes først med det fugtede jordsubstrat, og de vejede orme anbringes på overfladen. Sunde orme graver sig normalt omgående ned i substratet, og eventuelle orme, der måtte være tilbage på overfladen efter 15 minutter, betragtes således som skadede og skal erstattes. Hvis orme erstattes, vejes de nye orme og de erstattede orme, således at den eksponerede gruppe ormes samlede levende vægt og beholderens samlede vægt med orme ved testens begyndelse er kendt.

23. Testkemikaliet tilsættes. Det bør ikke tilsættes til jorden før efter en halv time efter tilsætningen af ormene (eller hvis der er orme på jordoverfladen), således at direkte eksponering for testkemikalie ved hudkontakt undgås. Når testkemikaliet er et pesticid, kan det være hensigtsmæssigt at sprøjte det på jordoverfladen. Testkemikaliet bør påføres så jævnt som muligt på jordoverfladen ved hjælp af en egnet laboratoriesprøjte for at simulere sprøjteanvendelse i marken. Før påføring fjernes testbeholderens låg, og det erstattes af en foring, som beskytter beholderens sidevægge mod sprøjt. Foringen kan bestå af en testbeholder, hvor bunden er fjernet. Påføringen finder sted ved en temperatur på 20 °C ± 2 °C og for vandige opløsninger, emulsioner eller spredninger ved en vandtilførselsrate på 600-800 μl/m^2. Raten kontrolleres ved hjælp af en egnet kalibreringsteknik. Særlige formuleringer som granulat- eller frøblandinger påføres på en måde, der er i overensstemmelse med praksis i landbruget.

24. Testbeholdere efterlades udækkede i en time, så eventuelt flygtigt opløsningsmiddel, som er knyttet til tilførslen af testkemikaliet, kan fordampe. De skal sikres, at ingen orme slipper ud af testbeholderne i dette tidsrum.

FREMGANGSMÅDE

Testgrupper og kontrolgrupper

25. En belastning på ti regnorme i 500-600 g tørmasse syntetisk jord (dvs. 50-60 g jord pr. orm) anbefales. Hvis der bruges større mængder jord, hvilket kan være tilfældet, hvis der testes pesticider med særlige påføringsmetoder, f.eks. frøbehandlinger, bevares belastningen på 50-60 g jord pr. orm ved at øge antallet af orme. Der klargøres ti orme pr. kontrol- og behandlingsbeholder. Ormene vaskes med vand og tørres af og anbringes derefter på absorberende papir i en kort periode for at dræne overskydende vand.

26. For at undgå systematiske fejl i forbindelse med fordelingen af ormene i testbeholderne bør testpopulationens homogenitet bestemmes ved enkeltvist at veje 20 orme, som er udtaget vilkårligt fra den population, hvorfra testormene skal tages. Når der er sikret homogenitet, udvælges partier af orme, som vejes og fordeles i testbeholderne i henhold til en randomiseringsprocedure. Efter tilsætning af testormene vejes hver testbeholder, således at der

▼M6

foreligger en startvægt, der kan bruges som grundlag for overvågning af jordens fugtindhold under testen, som beskrevet i punkt 30. Testbeholderne overdækkes derefter som beskrevet i punkt 9 og anbringes i testkammeret.

27. Der klargøres egnede kontroller for hver af de metoder til påføring af testkemikalier, der er beskrevet i punkt 18-24. De relevante beskrevne fremgangsmåder følges ved klargøring af kontrollerne, bortset fra at testkemikaliet ikke tilsættes. Når det er relevant, tilsættes organiske opløsningsmidler, kvartssand eller andre bærestoffer således til kontrollerne i samme koncentrationer/mængder som dem, der bruges til behandlingerne. Hvis et opløsningsmiddel eller et andet bærestof bruges til at tilsætte testkemikaliet, klargøres og testes en yderligere kontrol uden bærestoffet eller testkemikaliet, for at sikre at bærestoffet ikke har indflydelse på resultatet.

Testbetingelser

28. Testtemperaturen er 20 °C ± 2 °C. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 16 timers lys og 8 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholdernes område.

29. Testbeholderne beluftes ikke under testen, men testbeholdernes låg bør være udformet således, at de tillader gasudveksling og samtidig begrænser afdampning af fugt (se punkt 9).

30. Vandindholdet i jordsubstratet i testbeholderne opretholdes under hele testen ved at veje testbeholderne (uden låg) regelmæssigt. Tab erstattes efter behov med deioniseret vand. Vandindholdet bør ikke afvige mere end 10 % fra vandindholdet i begyndelsen af testen.

Fodring

31. Foder af en kvalitet, der har vist sig egnet til mindst at holde ormenes vægt under testen, betragtes som acceptabelt. Erfaringer har vist, at havregryn eller ko- eller hestegødning er egnet foder. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke medicineres eller behandles med kemikalier som f.eks. vækstfremmende stoffer, nematicider eller lignende veterinære produkter, der kan have negative virkninger på ormene under testen. Selvindsamlet kogødning anbefales, eftersom erfaringerne viser, at kommercielt tilgængelig kogødning brugt som havegødning kan have negative virkninger på ormene. Gødningen lufttørres, findeles og pasteuriseres inden brug.

32. Hvert frisk parti foder gives til en ormebestand (ikke test) inden brug i en test, for at sikre at det er af passende kvalitet. Vækst og kokondannelse må ikke være mindre end hos orme, der holdes i et substrat, som ikke indeholder det nye parti foder (betingelser som beskrevet i testmetoden C.8(4)).

33. Foder gives først en dag efter tilsætning af ormene og påføring af testkemikalie på jorden. Ca. 5 g foder spredes ud på jordoverfladen i hver beholder og fugtes med deioniseret vand (ca. 5-6 ml pr. beholder). Derefter gives der foder en gang om ugen i testperioden på fire uger. Hvis foder

▼M6

ikke bliver spist, skal rationen reduceres med henblik på at forebygge svampevækst og mug. De voksne individer fjernes fra jorden på testens 28. dag. Der fordeles yderligere 5 g foder i hver testbeholder. Ingen yderligere fodring finder sted i testens resterende fire uger.

Udvælgelse af testkoncentrationer

34. Forhåndskendskab til testkemikaliets toksicitet kan hjælpe til at finde passende testkoncentrationer, f.eks. fra en hurtig test (4) og/eller fra undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval. Når det er nødvendigt, udføres der en test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100 og 1 000 mg/kg (tørmasse af jord). En replikat pr. behandling og kontrol er tilstrækkelig. Varigheden af testen til bestemmelse af dosisinterval er to uger, og dødeligheden vurderes ved afslutningen af testen.

Forsøgsdesign

35. Eftersom der ikke kan foreskrives en bestemt sammenfattende statistik for testen, omfatter testmetoden bestemmelse af NOEC og EC_x. Tilsynsmyndighederne vil sandsynligvis stille krav om NOEC inden for den nærmeste fremtid. Der kan i den nærmeste fremtid blive tale om mere udbredt brug af EC_x ud fra statistiske og økologiske overvejelser. Der foreslås således tre design baseret på anbefalinger som følge af en ringtest af en formeringstestmetode med enchytraeider (17).

36. Når intervallet for koncentrationerne skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:

— For at bestemme NOEC skal der testes mindst fem/tolv koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor på højst 2,0.

— For at bestemme ECx (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) anbefales et tilstrækkeligt antal koncentrationer til at forårsage mindst fire statistisk signifikant forskellige gennemsnitsresponser ved de pågældende koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentration og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.

— En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og ECx. Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

Testvarighed og -målinger

37. På dag 28 observeres og tælles de levende voksne orme. Enhver usædvanlig adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden, ubevægelighed) og usædvanlig morforlogi (f.eks. åbne sår) registreres også. Alle voksne orme fjernes derefter fra testbeholderne og tælles og vejes. Overførsel af den jord, der indeholder ormene, til en ren bakke forud for vurderingen kan lette søgningen efter de voksne individer. De orme, der udtages fra jorden, vaskes inden vejningen (med deioniseret vand), og det overskydende vand fjernes ved kortvarigt at anbringe ormene på filterpapir. Orme, der ikke findes på dette tidspunkt, registreres som døde, eftersom det må antages, at sådanne orme er døde og nedbrudt inden vurderingen.

▼M6

38. Hvis jorden er blevet fjernet fra beholderne, returneres den nu (minus de voksne orme, men med eventuelle kokoner, der måtte være dannet). Jorden inkuberes derefter i yderligere fire uger under samme testbetingelser, bortset fra at fodring kun finder sted en gang i begyndelsen af denne testfase (se punkt 33).

39. Ved afslutningen af den anden periode på fire uger bestemmes antallet af unger, der er klækket af kokonerne i testjorden, og antallet af kokoner ved hjælp af fremgangsmåden i tillæg 5. Alle tegn på skader på ormene registreres også i hele testperioden.

Grænsetest

40. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til fastlæggelse af dosisområdet (dvs. 1 000 mg/kg), udføres formeringstesten som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg. En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at NOEC for formering er større end grænsekoncentrationen, og samtidig minimere det antal orme, der bruges i testen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrollen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

41. Tillæg 6 indeholder en oversigt, men testmetoden giver ingen endelig statistisk vejledning i analyse af testresultaterne.

42. Et af endepunkterne er dødelighed. Ændringer i de voksne individers adfærd (f.eks. manglende evne til at grave sig ned i jorden; orme, der ligger ubevægelige op ad testbeholderens glasvæg) og morfologi (f.eks. åbne sår) registreres dog også sammen med tilstedeværelsen af eventuelle unger. Der bruges normalt probabilistisk analyse (18) eller logistisk regression til at bestemme LC_{50}. I tilfælde hvor denne analysemetode er uegnet (f.eks. hvis der foreligger under tre koncentrationer med delvis dødelighed), kan der bruges alternative metoder. Disse metoder kan omfatte glidende gennemsnit (19), Trimmed Spearman-Karber-metoden (20) eller simpel interpolation (f.eks. geometrisk gennemsnit af LC_0 og LC_{100} som beregnet ved kvadratroden af LC_0 ganget med LC_{100}).

43. Det andet endepunkt er frugtbarhed (f.eks. antal unger). Som i testen til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade dog anføres i den endelige rapport. I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit $\bar{x}$ og standardafvigelsen pr. behandling og pr. kontrol for at beregne reproduktionen.

44. Hvis der er foretaget en variansanalyse, kan standardafvigelsen, s, og frihedsgraderne, df, erstattes af henholdsvis det samlede variansestimat fra variansanalysen og frihedsgraderne herfra — forudsat at variansen ikke afhænger af koncentrationen. I dette tilfælde bruges kontrollernes og behandlingernes individuelle varianser. Disse værdier beregnes normalt med kommerciel statistisk software, der bruger resultater pr. beholder som replikater. Hvis det skønnes mere hensigtsmæssigt at samle data for de negative kontroller og opløsningsmiddelkontrollerne end at teste dem hver for sig, skal de testes for at konstatere, at de ikke er signifikant forskellige (punkt 47 og tillæg 6 indeholder beskrivelser af egnede test).

45. Yderligere statistisk testning og følgeslutning afhænger af, hvorvidt replikatværdierne er normalt fordelt og er homogene med hensyn til varians.

▼M6

Beregning af NOEC

46. Anvendelse af stærke statistiske test foretrækkes. Der bør bruges oplysninger fra f.eks. tidligere erfaring med ringtest eller andre historiske oplysninger om, hvorvidt data er nogenlunde normalt fordelt. Varianshomogenitet (homoskedasitet) er mere afgørende. Erfaringer viser, at variansen ofte stiger med stigende gennemsnit. I disse tilfælde kan transformation af data medføre homoskedasitet. En sådan transformation bør dog være baseret på erfaring med historiske data snarere end på data, der undersøges. Med homogene data udføres flere t-test, såsom Williams' test ($\alpha = 0{,}05$, ensidet) (21)(22) eller i visse tilfælde Dunnetts test (23)(24). Det skal bemærkes, at t-værdierne i tabellen — i tilfælde af ulige replikation — skal korrigeres i henhold til Dunnett og Williams. Nogle gange stiger/falder responserne ikke regelmæssigt på grund af stor variation. I dette tilfælde, hvor der er tale om en kraftig afvigelse fra monotoni, er Dunnetts test mere velegnet. Hvis der er afvigelser fra homoskedasitet, kan det være fornuftigt at undersøge mulige virkninger på varians nærmere, for at beslutte om der kan bruges t-test uden at miste betydelig styrke (25). Alternativt kan der bruges flere U-test, f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm (26), eller når dataene udviser heteroskedasitet, men ellers svarer til et underliggende monotont dosis/respons-forhold, en anden ikke-parametrisk test [f.eks. Jonckheere-Terpstra (27)(28) eller Shirley (29)(30)], som generelt ville være at foretrække frem for t-test justeret for forskel i varians (se også figuren i tillæg 6).

47. Er der udført en grænsetest, og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan den parvise Student-t-test bruges eller alternativt Mann-Whitney-U-testen (31).

Beregning af EC_x

48. For at beregne enhver EC_x-værdi bruges middelværdierne pr. behandling til regressionsanalyse (lineær eller ikke-lineær), når der er opnået et passende dosis/respons-forhold. For ormenes vækst som en kontinuerlig respons kan EC_x-værdier estimeres ved hjælp af passende regressionsanalyse (32). Blandt egnede forhold for kvantale data (dødelighed/overlevelse og afkom) er normale sigmoidforhold, logistiske forhold eller Weibull-forhold, som omfatter to til fire parametre, hvoraf nogle også kan modellere hormetiske responser. Hvis et dosis/respons-forhold blev bestemt ved lineær regressionsanalyse, bør en signifikant r^2 (determinationskoefficient) og/eller hældning findes ved regressionsanalyse, inden EC_x bestemmes ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den ligning, der er fundet ved regressionsanalyse. 95 % konfidensgrænser beregnes ifølge Fieller (nævnt i Finney (18)) eller andre moderne passende metoder.

49. Alternativt modelleres responsen som en procentdel eller andel af modelparametre, hvilket fortolkes som kontrollernes gennemsnitsrespons. I disse tilfælde kan den normale (logistiske, Weibull-) sigmoidkurve ofte let tilpasses til resultaterne ved hjælp af den probabilistiske regressionsmetode (18). I disse tilfælde skal vægtningsfunktionen justeres for metrisk respons, jf. Christensen (33). Hvis der er konstateret hormese, bør den probabilistiske analyse erstattes af en logistisk funktion med fire parametre eller Weibull-funktion tilpasset med den ikke-lineære regressionsmetode (34). Hvis et passende dosis/respons-forhold ikke kan tilpasses til dataene, kan der bruges andre metoder til at bestemme EC_x og værdiens konfidensgrænser, f.eks. glidende gennemsnit i henhold til Thompson (19) og Trimmed Spearman-Karber-metoden (20).

TESTRAPPORT

50. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

▼**M6**

Testkemikalie:

— en endelig beskrivelse af testkemikaliet, parti, batch og CAS-nummer, renhed

— testkemikaliets egenskaber (f.eks. log Kow, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og oplysninger om skæbne og adfærd).

Testorganismer:

— anvendte testdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser

— alder, interval for testorganismers størrelse (masse).

Testbetingelser:

— oplysninger om klargøring af testjorden

— jordens maksimale vandholdende evne

— en beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilføre testkemikaliet til jorden

— oplysninger om hjælpekemikalier, der bruges til administration af testkemikaliet

— oplysninger om kalibrering af eventuelt sprøjteudstyr

— beskrivelse af forsøgsdesign og procedure

— testbeholdernes størrelse og mængde testjord

— testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklussernes varighed, temperatur

— en beskrivelse af fodringen, typen og mængden af foder anvendt i testen, fodringsdatoer

— jordens pH- og vandindhold ved påbegyndelse og afslutning af testen.

Testresultater:

— dødelighed for voksne individer (%) i hver testbeholder ved afslutningen af de første fire uger af testen

— den samlede mængde voksne individer i hver testbeholder ved begyndelsen af testen

— ændringer i levende voksne individers kropsvægt (% af startvægt) i hver testbeholder efter de første fire uger af testen

— antal unger afkom fremkommet i hver testbeholder ved afslutningen af testen

— en beskrivelse af synlige eller patologiske symptomer eller tydelige adfærdsændringer

— resultater opnået med referencetestkemikaliet

— LC_{50}, NOEC og/eller EC_x (f.eks. EC_{50}, EC_{10}) for formering, hvis nogle af værdierne er udtrykt med konfidensintervaller, og en graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning heraf og alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne

— en afbildning af dosis/respons-forholdet

— resultaterne for hver testbeholder

Afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

(1) J. Jaenicke (1982), »*Eisenia foetida*« is two biological species, Megadrilogica 4, 6-8.

(2) N. Oien og J. Stenerson (1984), Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species, Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277-282.

▼**M6**

(3) C. Kula (1996), Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests, in: F. Riepert og C. Kula (1996), Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms, Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, s. 50-82.

(4) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(5) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.

(6) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Del 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1, ISO, Genève.

(7) SETAC (1998), Advances in Earthworm Ecotoxicology. S. C. Sheppard, J. D. Bembridge, M. Holmstrup og L. Posthuma (eds), SETAC Press, s. 456 ff.

(8) EPA (1996), Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00), United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA712-C-96-167, april 1996.

(9) M. B. Bouché (1972), Lombriciens de France, Ecologie et systématique, Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) C. A. Edwards (1983), Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, Europa-Kommissionen.

(11) P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards og F. Heimbach (eds.) (1992), Ecotoxicology of Earthworms, Intercept.

(12) C. A. Edwards og J. P. Bohlen (1996), Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition, Chapman and Hall, London.

(13) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

(14) K. Hund-Rinke, J. Römbke, F. Riepert og R. Achazi (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests, in: Toxikologische Beurteilung von Böden. S. Heiden, R. Erb, W. Dott og A. Eisentraeger (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1992), Soil Quality — Determination of water retention characteristics — Laboratory methods, No. 11274, ISO, Genève.

(16) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465, ISO, Genève.

(17) J. Römbke og Th. Moser (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99, s. 150 + s. 223 ff.

▼**M6**

(18) D. J. Finney (1971), Probit Analysis (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.

(19) D. J. Finney (1978), Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

(22) D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) C. W. Dunnett (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) C. W. Dunnett (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control, Biometrics 20, 482-491.

(25) N. van der Hoeven (1998), Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?, Ecotoxicology 7: 355-361.

(26) S. Holm (1979), A simple sequentially rejective multiple test procedure, Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) A. R. Jonckheere (1954), A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) T. J. Terpstra (1952), The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) E. A. Shirley (1979), The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) D. A. Williams (1986), A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research, 2nd edition, W. H. Freeman and Company, New York.

(32) R. D. Bruce og D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(33) E. R. Christensen (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18, 213-221.

(34) P. H. Van Ewijk og J. A. Hoekstra (1993), Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present, Ecotox, Environ. Safety 25, 25-32.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

I denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

EC_x (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC_{50} er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode. I denne test udtrykkes effektkoncentrationerne som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord.

LC_0 (ikke-dødelig koncentration) er den koncentration af et testkemikalie, der ikke dræber nogen af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_0 som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LC_{50} (dødelig koncentration 50 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 50 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_{50} som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord.

LC_{100} (dødelig koncentration 100 %) er den koncentration af et testkemikalie, der dræber 100 % af de eksponerede testorganismer inden for et givet tidsrum. I denne test udtrykkes LC_{100} som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$). I denne test udtrykkes LOEC som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord eller som en masse af testkemikalie pr. arealenhed jord. Alle testkoncentrationer over LOEC bør normalt udvise en effekt, der er statistisk forskellig fra kontrollen. Eventuelle afvigelser fra ovenstående skal begrundes i testrapporten.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den højeste testkemikaliekoncentration umiddelbart under LOEC, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

Reproduktionsrate: Det gennemsnitlige antal unger, der er produceret pr. antal voksne individer i løbet af testperioden.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne har vist sig at være hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2 (1).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, der påfyldes vand, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

KILDER:

1) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1996), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Del 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.

▼**M6**

Tillæg 3

Bestemmelse af jordens pH

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (1).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sit volumen af enten en 1 M opløsning af kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid ($CaCl_2$) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes grundigt i fem minutter og henstår til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

KILDER:

1) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

▼**M6**

Tillæg 4

DYRKNING AF EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI

Dyrkning bør fortrinsvis foregå i et klimakammer ved 20 °C ± 2 °C. Ved denne temperatur og med tilstrækkeligt foder bliver ormene modne efter ca. 2-3 måneder.

Begge arter kan dyrkes i forskellige dyreekskrementer. Det anbefalede dyrkningssubstrat er en blanding af lige dele heste- eller kogødning og tørv. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke medicineres eller behandles med kemikalier som f.eks. vækstfremmende stoffer, nematicider eller lignende veterinære produkter, der kan have negative virkninger på ormene under testen. Selvindsamlet gødning fra en »økologisk« kilde anbefales, eftersom erfaringerne viser, at kommercielt tilgængelig gødning brugt som havegødning kan have negative virkninger på ormene. Substratet skal have en pH-værdi på ca. 6-7 (justeret med calciumcarbonat) og en lav ionledningsevne (under 6 mS/cm eller 0,5 % saltkoncentration), og det må ikke være uforholdsmæssigt forurenet med ammoniak eller dyreurin. Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Avlekasser med en kapacitet på 10-50 liter er velegnede.

For at få orme af standardalder og -størrelse er det bedst at starte dyrkningen med kokoner. Når bestanden er etableret, vedligeholdes den ved at anbringe voksne orme i en avlekasse med frisk substrat i 14-28 dage for at tillade dannelse af flere kokoner. De voksne individer fjernes derefter, og ungerne fra kokonerne bruges som grundlag for den næste bestand. Ormene fodres kontinuerligt med animalsk affald og flyttes fra tid til anden til frisk substrat. Erfaringer har vist, at lufttørret findelt ko- eller hestegødning eller havregryn er egnet foder. Det skal kontrolleres, at de køer eller heste, hvorfra gødningen kommer, ikke behandles medicinsk med kemikalier som f.eks. vækstfremmende stoffer, der kan have negative virkninger på ormene ved langtidsdyrkning. De orme, der klækkes af kokonerne, bruges til test, når de er 2-12 måneder gamle og betragtes som voksne individer.

Orme betragtes som sunde, hvis de bevæger sig gennem substratet, ikke forsøger at forlade substratet og formerer sig løbende. Meget langsom bevægelse eller gul bagende indikerer udtømning af substrat. I det tilfælde bør der gives frisk substrat, og/eller antallet af orme pr. beholder bør reduceres.

▼M6

Tillæg 5

TEKNIKKER TIL TÆLLING AF UNGER KLÆKKET AF KOKONER

Håndsortering af orme fra jordsubstratet er meget tidskrævende. To alternative metoder anbefales derfor:

a) Testbeholderne anbringes i et vandbad — først ved en temperatur på 40 °C, men stigende til 60 °C. Efter en periode på omkring 20 minutter bør ungerne dukke op ved jordoverfladen, hvorfra de let kan fjernes og tælles.

b) Testjorden kan skylles gennem en sigte med den metode, der er udviklet af van Gestel et al. (1), forudsat at den sphagnum og gødning eller det havregryn, der er blevet tilsat til jorden, var formalet til et fint pulver. To sigter med en maskestørrelse på 0,5 mm (diameter 30 cm) anbringes oven på hinanden. Indholdet af en testbeholder skylles gennem sigten med en kraftig stråle ledningsvand, hvilket efterlader ungerne og kokonerne primært i den øverste sigte. Det skal bemærkes, at hele den øverste sigtes overflade skal holdes våd under denne operation, så ungerne flyder på en vandfilm, hvilket forhindrer dem i at krybe gennem sigtens huller. De bedste resultater opnås, når der bruges et bruserhoved.

Når alt jordsubstratet er skyllet gennem sigten, kan unger og kokoner skylles fra den øverste sigte ned i en skål. Skålens indhold lades henstå, og tomme kokoner flyder på vandoverfladen, mens fulde kokoner og unger synker til bunds. Det stående vand kan derefter hældes ud, og unger og kokoner flyttes til en petriskål med en smule vand. Ormene kan fjernes med en nål eller en pincet med henblik på tælling.

Erfaringer har vist, at metode a) er bedre egnet til ekstraktion af unger, der kan skylles gennem selv en sigte med en maskestørrelse på 0,5 mm.

Effektiviteten af den metode, der bruges til at fjerne ormene (og eventuelle kokoner) fra jordsubstratet, skal altid bestemmes. Hvis unger indsamles ved håndsortering, anbefales det at gennemføre operationen to gange for alle prøver.

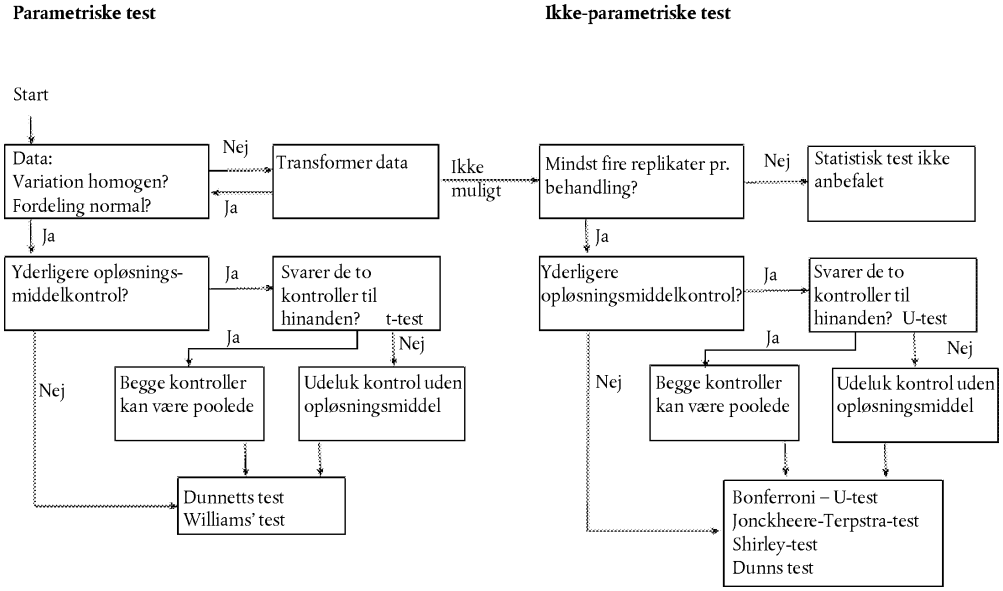
KILDER:

(1) C. A. M. Van Gestel, W. A. van Dis, E.M. van Breemen og P. M. Sparenburg (1988), Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments, Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Tillæg 6

Oversigt over den statistiske vurdering af data (bestemmelse af NOEC)



▼M6

C.34. BESTEMMELSE AF HÆMNINGEN AF ANAEROBE BAKTERIERS AKTIVITET — REDUKTION AF GASPRODUKTION FRA AKTIVT (SPILDEVANDS)SLAM MED ANAEROB UDRÅDNING

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 224 (2007). Kemikalier, der udledes til vandmiljøet, ledes gennem både aerobe og anaerobe zoner, hvor de kan nedbrydes og/eller kan hæmme bakterieaktivitet; i visse tilfælde kan de forblive uforstyrret i anaerobe zoner i årtier eller længere. I forbindelse med spildevandsbehandling er den første fase, primær sedimentering, aerob i supernatantvæsken og anaerob i subnatantslammet. Det følges i den sekundære fase af en aerob zone i beluftningstanken til aktiveret slam og en anaerob zone i subnatantslammet i den sekundære sedimenteringstank. Slam fra begge disse faser underkastes sædvanligvis anaerob behandling, hvor der produceres methan og kuldioxid, der normalt bruges til at producere elektricitet. I det bredere miljø vil kemikalier, der når sedimenter i bugter, flodmundinger og havet, sandsynligvis forblive i disse anaerobe zoner på ubestemt tid, hvis de ikke er bionedbrydelige. Større andele af visse kemikalier vil i højere grad nå disse zoner på grund af deres fysiske egenskaber, såsom lav opløselighed i vand, høj grad af adsorption til opslæmmede faststoffer samt manglende aerob bionedbrydelighed.

2. Det er ønskeligt, at kemikalier, der udledes til miljøet, er bionedbrydelige under både aerobe og anaerobe forhold, men det er vigtigt, at sådanne kemikalier ikke hæmmer mikroorganismers aktivitet i nogen af disse zoner. I Det Forenede Kongerige har der været nogle få tilfælde af fuldstændig inhibering af methanproduktion forårsaget af f.eks. pentachlorphenol i industrielt spildevand, hvilket har ført til meget dyr transport af inhiberet slam fra rådnetanke til »sikre« steder og import af sundt aktivt slam fra naboanlæg. Der har dog været mange tilfælde af mindre alvorlig afbrydelse af nedbrydning forårsaget af flere andre kemikalier, herunder alifatiske halogenerede kulbrinter (kemisk rensning) og rengøringsmidler, hvilket har medført betydelig begrænsning af nedbrydningseffektiviteten.

3. Kun en testmetode, C.11 (1), beskæftiger sig med hæmning af bakterieaktivitet (aktiveret slam — respirationshæmningstest) og vurderer testkemikaliets virkning på iltoptagelseshastigheden med substrat. Denne metode er blevet bredt anvendt til tidlig varsling af kemikaliers mulige skadelige virkninger på den aerobe spildevandsbehandling og til indikation af ikke-hæmmende koncentrationer af testkemikalier til brug i de forskellige bionedbrydelighedstest. Testmetode C.43 (2) giver begrænset mulighed for at bestemme et testkemikalies toksicitet for gasproduktionen i anaerobt slam, som er fortyndet til en tiendedel af sin normale koncentration af faststoffer for at give den nødvendige præcision i vurderingen af den procentvise bionedbrydning. Fordi fortyndet slam kan være mere følsomt over for inhiberende kemikalier, besluttede ISO-gruppen at udvikle en metode, hvor der bruges ufortyndet slam. Mindst tre tekster blev undersøgt (fra Danmark, Tyskland og Det Forenede Kongerig), og i sidste ende blev der udarbejdet to ISO-standarder — en, hvor der bruges ufortyndet slam, ISO 13 641-1 (3), og en, hvor der bruges 1 %-fortyndet slam, ISO 13 641-2 (4), hvilket skal repræsentere mudder og sedimenter med mindre bakteriepopulationer. Begge metoder blev underkastet en ringtest (5); del 1 blev bekræftet som en acceptabel standard, mens der var uenighed om del 2. Det Forenede Kongerige mente, at metoden kræver yderligere undersøgelse, fordi en stor del af deltagerne anførte meget begrænset eller ingen produktion af gas i rapporten, dels fordi luftrummet i procent var for højt (75 %) til optimal følsomhed.

4. Ældre værker i Det Forenede Kongerige (6)(7) beskrev en manometrisk metode, hvor der bruges ufortyndet aktivt slam plus ubearbejdet kloakslam som substrat i 500 ml-kolber; apparaturet var besværligt at arbejde med, og det ubehandlede slam gav anledning til en modbydelig stank. Senere blev det mere kompakte og hensigtsmæssige apparatur, der blev opfundet af Shelton og Tiedje (8) og udviklet af Battersby og Wilson (9), anvendt med succes af Wilson et al. (10). Kawahara et al. (11) fremstillede med

▼M6

succes flere typer standardslam til brug i test for anaerob bionedbrydelighed og inhibering med en række kemikalier. Ubearbejdet slam som substrat blev også erstattet, og der blev udført test med enten 1 %-fortyndet anaerobt slam eller med mudder, sedimenter osv. med begrænset bakterieaktivitet.

5. Denne metode kan tilvejebringe oplysninger, som kan bruges til at forudsige et testkemikalies sandsynlige effekt på gasproduktionen i anaerobe rådnetanke. Det er dog kun længerevarende test, der i højere grad simulerer fungerende rådnetanke, som kan give en indikation af, om mikroorganismerne kan tilpasse sig til testkemikaliet, eller om de kemikalier, der sandsynligvis vil blive absorberet af og adsorberet på slam, kan opbygges til en toksisk koncentration hen over en længere periode, end denne test tillader.

PRINCIP FOR TESTEN

6. Alikvoter af en blanding af anaerobt aktivt slam (20 g/l til 40 g/l faststoffer i alt) og en nedbrydelig substratopløsning inkuberes alene og samtidig med en række koncentrationer af testkemikaliet i forseglede beholdere i op til tre dage. Den producerede mængde gas (methan plus kuldioxid) måles ved trykstigningen (Pa) i kolberne. Den procentvise hæmning af gasproduktion forårsaget af de forskellige koncentrationer af testkemikaliet beregnes på grundlag af de mængder, der produceres i de respektive test- og kontrolkolber. EC_{50} og andre effektive koncentrationer beregnes på grundlag af afbildninger af hæmningen i procent mod koncentrationen af testkemikalierne eller i højere grad dens logaritme.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Testkemikalier bør normalt bruges i den reneste, umiddelbart tilgængelige form, eftersom urenheder i visse kemikalier, f.eks. chlorphenoler, kan være langt mere toksiske end selve kemikaliet. Behovet for at teste kemikalier i den form, hvori de fremstilles/gøres kommercielt tilgængelige, bør dog overvejes. Det kan ikke rutinemæssigt anbefales at bruge formulerede produkter, men for testkemikalier med ringe opløselighed kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ. Egenskaber for testkemikaliet, der bør foreligge, omfatter opløselighed i vand og visse organiske opløsningsmidler, damptryk, adsorptionskoefficient, hydrolyse og bionedbrydelighed under anaerobe betingelser.

METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

8. Testen kan anvendes på kemikalier, som er opløselige eller uopløselige i vand, herunder flygtige kemikalier. Der bør dog udvises forsigtighed med stoffer med ringe opløselighed i vand (jf. henvisning (12)) og en høj grad af flygtighed. Der kan også bruges inokula fra andre anaerobe steder, f.eks. mudder, mættet jord og sedimenter. Anaerobe bakteriesystemer, der tidligere har været eksponeret for toksiske kemikalier, kan tilpasses, således at de bevarer deres aktivitet ved tilstedeværelse af xenobiotiske kemikalier. Inokula fra tilpassede bakteriesystemer kan udvise en højere grad af tolerance over for testkemikalierne sammenlignet med inokula fra ikke-tilpassede systemer.

REFERENCEKEMIKALIER

9. For at kontrollere fremgangsmåden testes et referencekemikalie ved at opstille egnede beholdere parallelt som led i de almindelige testserier; 3,5-dichlorphenol har vist sig at være en konsekvent hæmmer af anaerob gasproduktion såvel som af aktiveret slams iltforbrug og andre biokemiske reaktioner. To andre kemikalier har vist sig i at hæmme methanproduktion i højere grad end 3,5-dichlorphenol, nemlig methylen-bis-thiocyanat og pentachlorphenol, men resultaterne med disse kemikalier er ikke valideret. Pentachlorphenol anbefales ikke, eftersom det ikke er umiddelbart tilgængeligt i ren form.

▼M6

RESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. I en international ringtest (5) var der blandt de ti deltagende laboratorier kun rimelig reproducerbarhed i EC_{50}-værdier for 3,5-dichlorphenol og 2-brom-ethansulfonsyre (intervallet for førstnævnte var 32-502 mg/l og for sidstnævnte 220-2 190 mg/l).

Antal laboratorier	I mg/l			I mg/g slam		
	gennemsnit	s.d.	vk (%)	gennemsnit	s.d.	vk (%)
	3,5-dichlorphenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-brom-ethansulfonsyre					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50}-data fra ringtest — ufortyndet slam

11. De høje variationskoefficienter mellem laboratorier afspejler i vid udstrækning forskelle i slammets mikroorganismers følsomhed som følge af enten præeksponering eller ingen præeksponering for testkemikaliet eller andre kemisk beslægtede kemikalier. Den præcision, hvormed EC_{50}-værdien baseret på slamkoncentrationen blev bestemt, var knap nok bedre end den »volumetriske« værdi (mg/l). De tre laboratorier, som anførte præcisionen af deres EC_{50}-værdier for 3,5-dichlorphenol, udviste langt lavere variationskoefficienter (henholdsvis 22, 9 og 18 % for EC_{50} mg/g) end gennemsnittet for alle ti laboratorier. De individuelle gennemsnit for de tre laboratorier var henholdsvis 3,1, 3,2 og 2,8 mg/g. De lavere, acceptable variationskoefficienter i laboratorierne sammenlignet med de langt højere koefficienter mellem laboratoriernes værdier, nemlig 9-22 % jf. 92 %, indikerer, at der er store forskelle mellem de enkelte typer slams egenskaber.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

12. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:

a) Inkubator — gnistsikker og styret til 35 °C ± 2 °C.

b) Tryksikre testbeholdere af glas med en passende nominel størrelse ([1]), hver udstyret med et gastæt septum med belægning, som kan modstå ca. 2 bar eller 2×10^5 Pa (til belægning bruges f.eks. PTFE = polytetrafluorethen). Serumflasker af glas med et nominelt volumen på 125 ml og et faktisk volumen på ca. 160 ml, forseglet med serumflaskesepta ([2]) og crimplåg (aluminiumsringe), anbefales, men flasker med et samlet volumen på 0,1-1 liter kan også bruges.

([1]) Den anbefalede størrelse er 0,1-1 liter.

([2]) Det anbefales at bruge gastætte silikonesepta. Det anbefales desuden, at lågenes gastæthed, navnlig i forbindelse med septa af butylgummi, testes, da flere kommercielt tilgængelige septa ikke er tilstrækkeligt gastætte mod methan, og visse septa ikke forbliver tætte, når de gennembores med en nål under testbetingelserne.

— Gastætte coatede septa anbefales og skal bruges til flygtige kemikalier (visse kommercielle septa er forholdsvis tynde, under 0,5 cm, og forbliver ikke gastætte efter gennemboring med en kanyle).

— Septa af butylgummi (ca. 1 cm) anbefales, hvis teststofferne ikke er flygtige (de forbliver normalt gastætte efter gennemboring).

— Forud for testen anbefales det, at septaene undersøges nøje med hensyn til deres evne til at forblive gastætte efter gennemboring.

▼M6

c) Præcisionstrykmåler ([1]) med nål.

Samlet gasproduktion (methan plus kuldioxid) målt ved hjælp af en trykmåler, som er tilpasset til at kunne måle og udlufte den producerede gas. Et eksempel på et egnet instrument er en håndholdt præcisionstrykmåler, som er forbundet med en kanyle; en gastæt trevejsventil letter frigivelsen af overtryk (tillæg 1). Det er nødvendigt at holde det indre volumen i tryktransducerrør og -ventil så lavt som muligt, således at fejl som følge af manglende hensyntagen til udstyrets volumen forbliver ubetydelige.

d) Isolerede beholdere til transport af aktivt slam.

e) Trevejstrykventiler.

f) Sigte med maskestørrelse på 1 mm^2.

g) Tank til aktivt slam, en kolbe af glas eller polyethylen med høj densitet og en kapacitet på ca. 5 liter, som er udstyret med en omrører og en anordning til at lede en strøm af kvælstofgas (se punkt 13) gennem headspace.

h) Membranfiltre (0,2 μm) til sterilisering af substratet.

i) Mikrosprøjter til den gastætte forbindelse mellem tryktransduceren (se punkt 12 c) og headspace i flaskerne (se punkt 12 b); også til tilsætning af uopløseligt flydende teststof til kolberne.

j) Handskekasse — valgfri, men anbefalet — med et let, positivt kvælstoftryk.

Reagenser

13. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen. Der skal bruges kvælstofgas af høj renhed med et iltindhold på under 5 μl/l ilt til hele testen.

Vand

14. Hvis fortynding er nødvendig på et hvilket som helst trin, bruges deioniseret vand, som forinden er afluftet. Det er ikke nødvendigt at foretage analytisk kontrol af vandet, men deioniseringsapparaturet skal vedligeholdes med jævne mellemrum. Der skal også bruges deioniseret vand til klargøring af stamopløsningerne. Inden tilsætningen af det anaerobe inokulum til en opløsning eller fortynding af teststof skal det sikres, at den pågældende opløsning/fortynding er fri for ilt. Det sker enten ved at blæse kvælstofgas gennem fortyndingsvandet (eller gennem fortyndingerne) i en time, inden inokulummet tilsættes, eller alternativt ved at opvarme fortyndingsvandet til kogepunktet og afkøle det til stuetemperatur i en iltfri atmosfære.

Udrådnet slam

15. Indsaml aktivt slam fra en rådnetank på et spildevandsanlæg — eller alternativt fra en laboratorierådnetank — der overvejende bruges til behandling husholdningsspildevand. Praktiske oplysninger om slam fra en laboratorierådnetank kan findes andetsteds (11). Hvis der skal bruges et tilpasset inokulum, kan det overvejes at bruge aktivt slam fra et industrielt rensningsanlæg. Brug kolber med bred hals fremstillet af polyethylen med høj densitet eller et tilsvarende materiale, som kan udvides, til indsamling af slam. Tilsæt slam til prøvetagningskolberne til omkring 1 cm fra kolbens top, forsegl dem, helst med en sikkerhedsventil (punkt 12 e), og anbring

([1]) Måleren bør bruges og kalibreres med regelmæssige mellemrum i henhold til producentens anvisninger. Hvis der bruges en trykmåler af den foreskrevne kvalitet, f.eks. indkapslet med en stålmembran, er det ikke nødvendigt med kalibrering i laboratoriet. Den skal kalibreres af et godkendt institut med de anbefalede intervaller. Kalibreringens nøjagtighed kan kontrolleres i laboratoriet med en etpunktsmåling ved 1×10^5 Pa i forhold til en trykmåler med mekanisk display. Når dette punkt måles korrekt, vil lineariteten også være uændret. Hvis der bruges andet måleudstyr (uden certificeret kalibrering hos producenten), anbefales omregning i hele området med jævne mellemrum (tillæg 2).

▼M6

kolberne i isolerede beholdere (punkt 12 d) for at minimere temperaturchok, indtil de overføres til en inkubator, der er holdt ved 35 °C ± 2 °C. Når kolben åbnes, frigives gasovertryk enten ved forsigtigt at løsne forseglingen eller ved hjælp af en trevejstrykventil (punkt 12 e). Det foretrækkes at bruge slammet inden for et par timer efter indsamlingen eller opbevare det ved 35 °C ± 2 °C under et headspace af kvælstof i op til tre dage, når der normalt forekommer begrænset tab af aktivitet.

Advarsel — Aktivt slam producerer brandfarlige gasser, som indebærer brand- og eksplosionsrisici: Det indeholder også potentielt patogene organismer, og der skal derfor træffes passende forholdsregler i forbindelse med håndtering af slam. Af sikkerhedsmæssige årsager må der ikke bruges glasbeholdere til indsamling af slam.

Inokulum

16. Umiddelbart inden brug blandes slammet ved forsigtigt at omrøre det og lede det gennem en sigte med en maskestørrelse på 1 mm^2 (punkt 12 f) ned i en egnet kolbe (punkt 12 g) gennem det headspace, hvorigennem der er ledt en strøm af kvælstof. Der udtages en prøve til måling af koncentrationen af tørstoffer (se f.eks. ISO 11 923 (13) eller en tilsvarende EU-standard). Generelt bruges slammet ufortyndet. Koncentrationen af faststoffer er sædvanligvis på 2-4 % (w/v). Slammets pH-værdi kontrolleres og justeres om nødvendigt til 7 ± 0,5.

Testsubstrat

17. Opløs 10 g næringsvæske (f.eks. oxoid), 10 g gærekstrakt og 10 g D-glucose i deioniseret vand, og fortynd til 100 ml. Steriliser ved filtrering gennem et 0,2 μm-membranfilter (punkt 12 h), og brug substratet med det samme, eller opbevar det ved 4 °C i højst en dag.

Testkemikalie

18. Klargør en stamopløsning for hvert vandopløseligt testkemikalie, som f.eks. skal indeholde 10 g/l af kemikaliet i iltfrit fortyndingsvand (punkt 14). Brug mængder af disse stamopløsninger, som er tilstrækkelige til at fremstille reaktionsblandingerne, der indeholder graduerede koncentrationer. Alternativt klargøres en fortyndingsserie af hver stamopløsning, således at den mængde, der tilsættes til testkolberne, er den samme for hver påkrævet slutkoncentration. Stamopløsningernes pH justeres om nødvendigt til 7 ± 0,2.

19. Hvis der er tale om testkemikalier, der ikke er tilstrækkeligt opløselige i vand, henvises til ISO 10 634 (12) eller en tilsvarende EU-standard. Hvis der skal bruges et organisk opløsningsmiddel, skal opløsningsmidler som chloroform and carbontetrachlorid undgås, da de har vist sig at virke stærkt hæmmende på methanproduktionen. Klargør en opløsning med en passende koncentration af vanduopløseligt kemikalie i et egnet flygtigt opløsningsmiddel, f.eks. acetone eller di-ethylether. Tilsæt den nødvendige mængde opløsningsmiddel til de tomme testkolber (punkt 12 b), og afdamp opløsningsmidlet inden tilsætning af slam. Ved andre behandlinger bruges ISO 10 634 (12) eller en tilsvarende EU-standard, men vær opmærksom på, at eventuelle overfladeaktive stoffer, der bruges til at producere emulsioner, kan virke hæmmende på den anaerobe gasproduktion. Hvis tilstedeværelsen af organiske opløsningsmidler og emulgeringsmidler menes at forårsage artefakter, kan testkemikaliet tilsættes direkte til testblandingen som et pulver eller en væske. Flygtige kemikalier og vanduopløselige flydende testkemikalier kan indsprøjtes i serumflasker med inokulum ved hjælp af mikrosprøjter (punkt 12 i).

▼M6

20. Tilsæt testkemikalier til kolberne for at opnå en geometrisk serie af koncentrationer, f.eks. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l og 15,6 mg/l. Hvis toksicitetsintervallet ikke er kendt fra lignende kemikalier, gennemføres der først en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med koncentrationer på 1 000 mg/l, 100 mg/l og 10 mg/l for at fastslå et passende interval.

Referencekemikalie

21. Klargør en vandig opløsning af 3,5-dichlorphenol (10 g/l) ved gradvist at tilsætte den minimale mængde 5 mol/l-natriumhydroxidopløsning til faststoffet under omrystning, indtil det er opløst. Tilsæt dernæst deoxygeneret fortyndingsvand (punkt 14) til den påkrævede mængde; sonikering kan fremme opløsning. Der kan bruges andre referencekemikalier, når det gennemsnitlige interval for EC_{50} er opnået i mindst tre test med forskellige inokula (forskellige kilder eller forskellige indsamlingstidspunkter).

INTERFERENS/FEJL

22. Visse bestanddele i slam kan antageligt reagere med potentielle inhibitorer og gøre dem utilgængelige for mikroorganismer og dermed forårsage lavere — eller ingen — inhibering. Desuden vil der, hvis slammet allerede indeholder et kemikalie, som er hæmmende, blive opnået forkerte resultater, når kemikaliet underkastes testen. Ud over disse muligheder kan en række identificerede faktorer føre til falske resultater. Disse faktorer er opført på listen i tillæg 3 sammen med metoder til at forhindre eller i det mindste reducere forekomsten af fejl.

TESTPROCEDURE

23. Det nødvendige antal replikater afhænger af den præcisionsgrad, der er påkrævet for inhiberingsindekserne. Hvis kolbernes låg er tilstrækkeligt gastætte under hele testen, skal der kun opstilles et parti (mindst tre) testkolber ved hver koncentration. Tilsvarende opstilles et parti kolber med referencekemikalie og et sæt kontroller. Hvis kolbernes låg kun er pålidelige til en eller nogle få gennemboringer, opstilles et parti (f.eks. tre) testkolber for hvert interval (t), for hvilket der kræves resultater for alle koncentrationer af et testkemikalie, der skal testes. Tilsvarende opstilles der »t« partier kolber for referencekemikaliet og for kontrollerne.

24. Det anbefales at bruge en handskekasse (punkt 12 j). Mindst 30 minutter før testen påbegyndes, ledes en strøm af kvælstofgas gennem handskekassen, som indeholder alt nødvendigt udstyr. Sørg for, at slammets temperatur er på 35 °C ± 2 °C under håndteringen og forseglingen af kolberne.

Indledende test

25. Hvis slammets aktivitet er ukendt, anbefales det at gennemføre en indledende test. Opstil kontroller til koncentrationer af faststoffer på 10 g/l, 20 g/l og 40 g/l plus substrat, men uden testkemikalie. Brug desuden forskellige volumener reaktionsblanding med henblik på at opnå tre eller fire headspacevolumen/væskevolumen-forhold. Ud fra resultaterne af det gasvolumen, der produceres på forskellige tidspunkter, bestemmes de bedst egnede betingelser, som giver mulighed for to daglige målinger med betydelige gasvolumener og frigivelse af tryk pr. dag ved optimal følsomhed ([1]) uden risiko for eksplosioner.

Tilsætning af testkemikalier

26. Tilsæt vandopløselige testkemikalier til tomme testkolber (punkt 12 b) som vandige opløsninger (punkt 18). Brug mindst tre sæt kolber til hver serie af koncentrationer (punkt 20). Hvis der er tale om uopløseligt og tungt opløseligt testkemikalie, indsprøjtes opløsninger af testkemikaliet i organiske opløsningsmidler med en mikrosprøjte i tomme kolber med henblik på at

([1]) Det gælder den forsøgsopstilling og de forsøgsbetingelser, hvor de producerede volumener gas — fra blindkontroller og fra beholdere med en hæmning på 70-80 % — kan skønnes med acceptable fejlmargener.

▼M6

opnå replikatsæt med hver fem koncentrationer af testkemikaliet. Afdamp opløsningsmidlet ved at lede en strøm af kvælstofgas hen over overfladen på opløsningerne i testkolberne. Alternativt tilsættes uopløselige faste kemikalier som afvejede mængder faststof direkte til testkolberne.

27. Hvis uopløselige og tungt vandopløselige flydende testkemikalier ikke tilsættes med et opløsningsmiddel, tilsættes de direkte med mikrosprøjte til testkolberne efter tilsætning af inokulum og testsubstrat (se punkt 30). Flygtige testkemikalier kan tilsættes på samme måde.

Tilsætning af inokulum og substrat

28. Omrør en passende mængde sigtet aktivt slam (se punkt 16) i en 5 l-kolbe (punkt 12g), imens en strøm af kvælstofgas ledes gennem headspace. Gennemskyl testkolber, som indeholder vandige opløsninger eller opløsninger af testkemikalier med afdampede opløsningsmidler, med en strøm af kvælstofgas i ca. to minutter for at fjerne luft. Fordel alikvoter, f.eks. 100 ml, af velblandet slam i testkolberne med en pipette med stor spids eller en målecylinder. Det er vigtigt, at pipetten fyldes på en gang til det nøjagtige foreskrevne volumen slam, fordi slamfaststoffer let bundfældes. Hvis der optages mere end det foreskrevne volumen, tømmes pipetten, og der startes forfra.

29. Tilsæt derefter en tilstrækkelig mængde substratopløsning (punkt 17) til at give en koncentration på 2 g/l af henholdsvis næringsvæske, gærekstrakt og D-glucose i blandingen, imens der fortsat gennemskylles med kvælstof. Følgende er et eksempel på testpartier.

Endelig massekoncentration af testkemikalie i testkolber (mg/l)	Volumen testkemikalie (ml)		Reagenser og substrater (ml)		
	Stamopløsning a) 10 g/l punkt 18	Stamopløsning b) 1 g/l punkt 18	Fortyndingsvand punkt 14	Inokulum punkt 16	Substrat punkt 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Kolbens volumen i alt = 160 ml Væskevolumen = 103 ml
Gasvolumen = 57 ml eller 35,6 % af det samlede volumen.

30. Gennemskyl på samme måde med kvælstofgas, og tøm testkolberne tilstrækkeligt til at håndtere eventuelt flygtigt og uopløseligt flydende testkemikalie (se punkt 27).

▼M6

Kontroller og referencekemikalie

31. Opstil mindst tre sæt kolber, som kun indeholder slam og substrat, og som skal fungere som kontroller. Opstil yderligere replikatkolber, som indeholder slam og substrat plus tilstrækkelig stamopløsning af referencekemikaliet, 3,5-dichlorphenol (punkt 21), til at give en slutkoncentration på 150 mg/l. Denne koncentration bør hæmme gasproduktionen med ca. 50 %. Opstil alternativt en serie af koncentrationer af referencekemikaliet. Opstil desuden fire ekstra kolber til pH-måling, som indeholder slam, deoxygeneret vand og substrat. Tilsæt testkemikaliet til to kolber ved den højeste koncentration, der testes, og tilsæt deoxygeneret vand til de to resterende kolber.

32. Sørg for, at alle kolber — test- og referencekemikalier og kontroller — indeholder samme volumen (V_R) væske; tilsæt om nødvendigt deoxygeneret deioniseret vand (punkt 14) for at fylde op til volumen. Headspace bør være på 10-40 % af kolbens volumen, og den faktiske værdi vælges på baggrund af de data, der er opnået i den indledende test. Når alle bestanddele er tilsat til kolberne, fjernes den nål, der leverer gassen, og hver kolbe forsegles med en gummiprop og et aluminiumslåg (punkt 12 b), idet proppen fugtes med en dråbe deioniseret vand for at lette isætningen. Bland indholdet i hver kolbe ved omrystning.

Inkubering af kolber

33. Flyt kolberne til den termostatstyrede inkubator, som helst skal være forsynet med en omrystningsanordning, og som holdes ved 35 °C ± 2 °C. Kolberne inkuberes i mørke. Efter ca. en time udlignes trykket i kolberne til atmosfærisk tryk ved at indføre kanylen, som er fastgjort til trykmåleren (punkt 12 c), gennem låget på hver kolbe efter tur, åbne ventilen, indtil trykmåleren viser nul, og dernæst lukke ventilen. Nålen skal indføres i en vinkel på ca. 45° for at forhindre gas i at sive ud af kolberne. Hvis kolberne inkuberes uden omrystningsanordning, skal de omrystes manuelt to gange om dagen i hele inkubationsperioden for at ækvilibrere systemet. Kolberne inkuberes og vendes om for at forhindre tab af gas gennem septum. Vending er dog ikke hensigtsmæssig, i tilfælde hvor uopløselige testkemikalier klæber til bunden af kolben.

Trykmåling

34. Når kolberne har nået en temperatur på 35 °C ± 2 °C, måles og registreres pH-værdien for indholdet i to af de fire kolber, der er opstillet til formålet, og indholdet kasseres; inkuberingen af de resterende kolber fortsættes i mørke. Trykket i kolberne måles og registreres to gange om dagen i de næste 48-72 timer ved at indsætte trykmålerens nål gennem låget på hver kolbe efter tur, idet nålen aftørres mellem målingerne. Hold alle dele af kolben ved inkubationstemperatur i løbet af målingen, som bør foregå så hurtigt som muligt. Aflæs trykket, når det stabiliserer sig, og registrer det. Åbn derefter ventilen med henblik på udluftning, og luk den, når trykket når nul. Testen fortsættes normalt i 48 timer fra tidspunktet for den første tryk-udligning, der betegnes »tid 0«. Antallet af aflæsninger og udluftninger skal for flygtige kemikalier begrænses til en (ved afslutningen af inkuberingen) eller to for at minimere tabet af testkemikalie (10).

35. Hvis trykket aflæses som negativt, må ventilen ikke åbnes. Nogle gange akkumuleres der fugt i kanylen og røret, hvilket kommer til udtryk ved en mindre negativ trykmåling. I givet fald fjernes nålen, røret omrystes og tørres med en klud, og der isættes en ny nål.

pH-måling

36. pH-værdien for indholdet i hver kolbe måles og registreres efter den sidste trykmåling.

▼M6

DATA OG RAPPORTERING

Angivelse af resultaterne

37. Beregn summen og gennemsnittet af de tryk, der er registreret for hvert tidsinterval for hvert sæt replikatkolber, og beregn det gennemsnitlige kumulerede bruttogastryk for hvert tidsinterval for hvert sæt replikater. Optegn kurver over den gennemsnitlige kumulerede gasproduktion (Pa) som funktion af tid for kontrol-, test- og referencekolber. Vælg et tidspunkt på den lineære del af kurven, normalt 48 timer, og beregn inhiberingen i procent (I) for hver koncentration ved hjælp af ligningen [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1]$$

hvor

I = inhibering i %

P_t = det producerede gastryk med teststoffet på det valgte tidspunkt, i pascal (Pa)

P_c = det producerede gastryk i kontrollen på samme tidspunkt, i pascal (Pa).

Det tilrådes at optegne begge kurver, dvs. kurve I som funktion af koncentration og også som funktion af logaritmen for koncentrationen, således at den kurve, der er tættest på linearitet, kan vælges. Vurder EC_{50}-værdien (mg/l) visuelt eller ved regressionsanalyse, ud fra den kurve der er tættest på linearitet. Med henblik på sammenligning kan det være mere hensigtsmæssigt at udtrykke koncentrationen af kemikaliet som mg kemikalie/g tørstof i alt. For at opnå denne koncentration divideres volumenkoncentrationen (mg/l) med volumenkoncentrationen af tørre slamfaststoffer (g/l) (punkt 16).

38. Beregn enten inhiberingen i procent opnået ved den enkelte koncentration af det anvendte referencekemikalie eller EC_{50}, hvis der er undersøgt et tilstrækkeligt antal koncentrationer.

39. Omregn det gennemsnitlige tryk for den gas, der er produceret i kontrollen P_c (Pa) til volumen ved henvisning til kalibreringskurven for trykmåleren (tillæg 2), og beregn på grundlag heraf gasudbyttet udtrykt som det volumen, der er produceret på 48 timer af 100 ml ufortyndet slam ved en faststofkoncentration på 2 % (20 g/l) til 4 % (40 g/l).

Validitetskriterier

40. Resultater fra ISO-forsøget blandt forskellige laboratorier (5) viste, at referencekemikaliet (3,5-dichlorphenol) forårsagede 50 % inhibering af gasproduktionen i et koncentrationsinterval på 32 mg/l til 510 mg/l, gennemsnit 153 mg/l (punkt 10). Dette interval er så bredt, at faste grænser for inhibering ikke kan fastsættes med sikkerhed som validitetskriterier; det bør være muligt, når udviklingen har vist, hvordan man fremstiller mere ensartede inokula. Det volumen gas, der blev produceret i kontrolkolberne på 48 timer, lå på mellem 21 ml/g og 149 ml/g tørre slamfaststoffer (gennemsnit 72 ml/g). Der var ingen åbenlys forbindelse mellem det producerede volumen gas og den tilsvarende EC_{50}-værdi. Den endelige pH varierede mellem 6,1 og 7,5.

41. Testen betragtes som gyldig, når der er opnået en inhibering på over 20 % i den referencekontrol, der indeholder 150 mg/l 3,5-dichlorphenol, der er produceret over 50 ml gas pr. g tørstof i blindkontrollen, og pH-værdien ligger i intervallet 6,2-7,5 ved afslutningen af testen.

Testrapport

42. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber

▼M6

— renhed (urenheder) af testkemikaliet.

Testbetingelser

— volumen af væske og headspace i testbeholderne

— beskrivelse af testbeholderne og gasmåling (f.eks. type trykmåler)

— tilsætning af testkemikalie og referencekemikalie til testsystemet, testkoncentrationer anvendte opløsningsmidler og brug af opløsningsmidler

— oplysninger om anvendt inokulum: rensningsanlæggets navn, beskrivelse af kilden til det behandlede spildevand (f.eks. driftstemperatur, slamretentionstid, overvejende husholdningsspildevand eller industrielt spildevand osv.), koncentration af faststoffer, gasproduktion i anaerob rådnetank, tidligere eksponering eller mulig præadaptation til toksiske kemikalier eller sted for indsamling af mudder, sedimenter osv.

— inkubationstemperatur og -interval

— antal replikater.

Resultater

— pH-værdier ved afslutningen af testen

— alle de måledata, der er indsamlet i test-, blind- og referencekemikaliekontrolbeholderne, alt efter hvad der er relevant (f.eks. tryk i Pa eller millibar), i tabelform

— inhibering i procent i test- og referencekolberne og inhibering/koncentration-kurver

— beregning af EC_{50}-værdier, udtrykt som mg/l og mg/g

— gasproduktion pr. g slam på 48 timer

— årsager til eventuel afvisning af testresultaterne

— diskussion af resultater, herunder eventuelle afvigelser fra fremgangsmåderne i testmetoden og diskussion af eventuelle afvigelser i testresultaterne som følge af interferens og fejl, i forhold til hvad der kan forventes

— angivelse af, hvorvidt formålet med testen var at måle toksiciteten for præeksponerede eller ikke-præeksponerede mikroorganismer.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.11 i dette bilag: Aktiveret slam, respirationshæmningstest.

(2) Kapitel C.43 i dette bilag: Organiske stoffers anaerobe bionedbrydelighed i udrådnet slam ved måling af gasproduktion.

(3) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000), Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2, Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria, BL 6958/A. M. R. Evans og H. A. Painter, Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) J. D. Swanwick og M. Foulkes (1971), Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons, Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986), Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge, ISBN 0 117519 43 X, in: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) D. R. Shelton og J. M. Tiedje (1984), General method for determining anaerobic biodegradation potential, Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) N. S. Battersby og V. Wilson (1988), Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions, Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) V. Wilson, H. A. Painter og N. S. Battersby (1992), A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge, Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology, Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Tyskland (1990). Eds. C. Steinberg og A. Kettrup, s. 117-132 (1992).

(11) K. Kawahara, Y. Yakabe, T. Chida og K. Kida (1999), Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals, Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

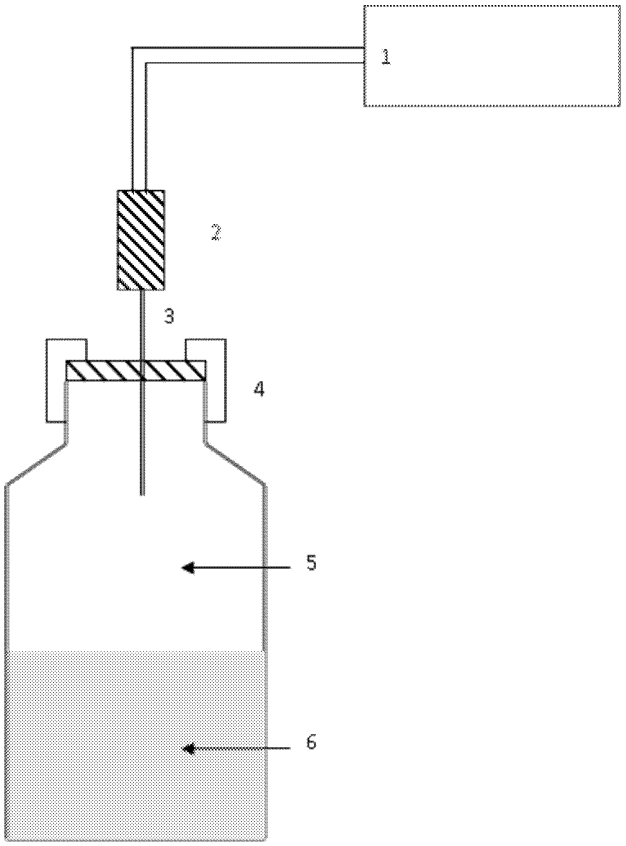
(12) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995), ISO 10 634, Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium.

(13) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1997) ISO 11 923, Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Tillæg 1

Eksempel på et apparat til måling af biogasproduktion ved hjælp af gastryk



Signaturforklaring:

1 — Trykmåler

2 — Gastæt trevejsventil

3 — Kanyle

4 — Gastæt forsegling (crimplåg og septum)

5 — Headspace

6 — Inokulum af udrådnet slam

Testbeholdere i et miljø på 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Tillæg 2

Omstilling af trykmåleren

Trykmåleraflæsningerne kan sættes i forhold til gasvolumen ved hjælp af en standardkurve, hvorfra det producerede volumen gas pr. g tørt slam pr. 48 timer kan beregnes. Dette aktivitetsindeks bruges som et af de kriterier, hvorudfra testresultaternes validitet vurderes. Kalibreringskurven frembringes ved at indsprøjte et kendt volumen gas ved 35 °C ± 2 °C i serumflasker, der indeholder et vandvolumen svarende til reaktionsblandingsvolumenet, V_R.

— Fordel V_R ml alikvoter vand, holdt ved en temperatur på 35 °C ± 2 °C, i fem serumflasker. Forsegl flaskerne, og anbring dem i et vandbad ved 35 °C ± 2 °C i en time med henblik på ækvilibrering.

— Tænd trykmåleren, lad den stabilisere sig, og nulstil den.

— Indfør kanylen gennem låget på hver af flaskerne, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.

— Gentag denne procedure med de resterende flasker.

— Indsprøjt 1 ml luft med en temperatur på 35 °C ± 2 °C i hver flaske. Indfør nålen (på trykmåleren) gennem låget på en af flaskerne, og aflæs trykket, når det stabiliserer sig. Registrer trykket, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.

— Gentag denne procedure med de resterende flasker.

— Gentag hele proceduren med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml og 50 ml luft.

— Optegn en omregningskurve for tryk (Pa) som funktion af indsprøjtet volumen gas (ml). Instrumentets respons er lineært i intervallet 0-70 000 Pa og 0-50 ml gasproduktion.

▼M6

Tillæg 3

Identificerede faktorer, der kan føre til falske resultater

a) *Flaskelågenes kvalitet*

Forskellige typer septa til serumflaskerne er kommercielt tilgængelige; mange af dem, herunder butylgummi, mister deres stramhed, når de gennembores af en nål under testbetingelserne. Nogle gange falder trykket meget langsomt, når septum er blevet gennemboret af kanylen. Brug af gastætte septa anbefales for at forhindre lækager (punkt 12 b).

b) *Fugt i kanylen*

Nogle gange akkumuleres der fugt i kanylen og røret, hvilket kommer til udtryk ved en mindre negativ trykmåling. For at afhjælpe dette fænomen fjernes nålen, røret omrystes og tørres med en klud, og der isættes en ny nål (punkt 12 c og punkt 35).

c) *Forurening med ilt*

Anaerobe metoder kan være behæftet med fejl som følge af forurening med ilt, som kan forårsage lavere gasproduktion. I denne metode bør denne mulighed minimeres ved brug af anaerobe teknikker, herunder brug af en handskekasse.

d) *Større substrater i slam*

Den anaerobe gasproduktion og slammets følsomhed påvirkes af substrater, der overføres til testkolberne med inokulummet. Udrådnet slam fra anaerobe rådnetanke til husholdningsspildevand indeholder ofte stadig genkendelige emner som hår og planterester af cellulose, hvilket kan gøre det vanskeligt at udtage repræsentative prøver. Ved at sigte slammet kan større uopløselige emner fjernes, hvilket gør repræsentativ prøveudtagning mere sandsynlig (punkt 16).

e) *Flygtige testkemikalier*

Flygtige testkemikalier vil blive frigivet til testkolbernes headspace. Det kan forårsage tab af en del af teststoffet fra systemet i forbindelse med udluftningen efter trykmålinger, hvilket giver falske høje EC_{50}-værdier. Fejlen kan reduceres ved at vælge det rette forhold mellem headspacevolumen og væskevolumen og ved ikke at udlufte efter trykmålinger (10).

f) *Manglende linearitet for gasproduktion*

Hvis kurven over den gennemsnitlige kumulative gasproduktion som funktion af inkubationstiden ikke er tilnærmelsesvis lineær i perioden på 48 timer, kan testen blive mindre nøjagtig. For at afhjælpe dette fænomen kan det være hensigtsmæssigt at bruge aktivt slam fra en anden kilde og/eller tilsætte en øget koncentration af testsubstrat-næringsvæske, gærekstrakt og glucose (punkt 29).

▼M6

Tillæg 4

Anvendelse på miljøprøver med lav biomassekoncentration — anaerobt mudder, sedimenter osv.

INDLEDNING

A.1 Generelt er den specifikke mikrobielle aktivitet (produceret volumen gas pr. g tørstof) i naturligt forekommende anaerobt mudder, sedimenter, jord osv. langt lavere end i anaerobt slam fra spildevand. Derfor skal visse af testbetingelserne ændres, når kemikaliers hæmmende effekt på disse mindre aktive prøver skal måles. Der er to generelle muligheder for disse mindre aktive prøver:

a) Gennemfør en ændret indledende test (punkt 25) med den ufortyndede prøve af mudder, jord osv. ved 35 °C ± 2 °C eller ved temperaturen på det sted, hvor prøven er udtaget, med henblik på en mere nøjagtig simulation (som i del 1 i ISO 13 641).

b) Gennemfør alternativt testen med fortyndet (1 til 100) aktivt slam for at simulere den lave aktivitet, der kan forventes af miljøprøven, men hold temperaturen på 35 °C ± 2 °C (som i del 2 i ISO 13 641).

A.2 Mulighed a) kan opnås ved at anvende den metode, der er beskrevet her (svarer til del 1 i ISO 13 641), men det er vigtigt at gennemføre en indledende test (punkt 25) for at fastslå de optimale betingelser, medmindre de allerede er kendt fra tidligere test. Mudder- eller sedimentprøven blandes omhyggeligt, f.eks. i en blender, og fortyndes om nødvendigt med en lille del afluftet fortyndingsvand (punkt 14), således at den er tilstrækkeligt flydende til at blive overført med en pipette med stor spids eller en målecylinder. Hvis man mener, at der mangler næringsstoffer, kan mudderprøven centrifugeres (under anaerobe betingelser) og resuspenderes i det uorganiske substrat, som indeholder gærekstrakt (A.11)

A.3 Mulighed b). Denne mulighed afspejler med rimelighed den lave aktivitet i miljøprøver, men mangler den høje koncentration af opslæmmede faststoffer, der er til stede i disse prøver. Disse faststoffers rolle i inhiberingen er ukendt, men det er muligt, at reaktion mellem testkemikaliet og bestanddele af mudderet, samt adsorption af testkemikaliet til faststofferne, kan føre til en lavere toksicitet for testkemikaliet.

A.4 Temperatur er en anden vigtig faktor: Med henblik på nøje simulation gennemføres test ved temperaturen på prøveudtagningsstedet, eftersom forskellige grupper af methanproducerende bakteriekolonier har vist sig at fungere inden for forskellige temperaturintervaller, navnlig termofile (~ 30-35 °C), mesofile (20-25 °C) og psykrofile bakterier (< 20 °C), som kan udvise forskellige inhiberingsmønstre.

A.5 Varighed. I den generelle test, del 1, var gasproduktionen i de 2-4 dage altid tilstrækkelig, når der blev brugt ufortyndet slam, mens der i del 2 med 1 % fortyndet slam blev produceret utilstrækkelig gas, hvis nogen, i denne periode i ringtesten. Ifølge Madsen et al. (1996), i deres beskrivelse af sidstnævnte test, bør varigheden være mindst syv dage.

Test med lav biomassekoncentration (mulighed b)

Følgende ændringer bør foretages ved tilføjelser til eller erstatning af visse eksisterende punkter og underpunkter i hovedteksten.

▼**M6**

A.6 I punkt 6 tilføjes: Princip for testen

»Denne teknik kan bruges med 1 % fortyndet anaerobt slam, til dels for at simulere den lave aktivitet i mudder og sedimenter. Inkubationstemperaturen kan være enten 35 °C eller temperaturen på det sted, hvor prøven blev udtaget. Eftersom bakterieaktiviteten er langt mindre end i ufortyndet slam, bør inkubationsperioden forlænges til mindst syv dage.«

A.7 I punkt 12 a tilføjes:

»Inkubatoren skal kunne operere ned til temperaturer på 15 °C.«

A.8 En ekstra reagens tilføjes efter punkt 13:

»Phosphorsyre (H_3PO_4), 85 vægtprocent i vand.«

A.9 Følgende tilføjes i slutningen af punkt 16:

»Brug en slutkoncentration på 0,20 ± 0,05 g/l tørstof i alt i testen.«

A.10 Præmis 17. Testsubstrat

Dette substrat må ikke bruges, men erstattes af gærekstrakt (se punkt 17, A.11, A.12, A.13).

A.11 Der skal bruges et uorganisk substrat, herunder sporstoffer, til fortynding af anaerobt slam, og for nemheds skyld tilsættes det organiske substrat, gærekstraktet, til dette substrat.

Følgende tilføjes efter punkt 17:

»a) Uorganisk testsubstrat med gærekstrakt.

Dette substrat fremstilles af et 10-dobbelt koncentreret testsubstrat (punkt 17 b, A.12) med en opløsning af sporstoffer (punkt 17 c, A.13). Brug frisk natriumsulfidnonahydrat (punkt 17 b, A.12), eller vask og tør det før brug, for at sikre at det har tilstrækkelig reducerende kapacitet. Hvis testen udføres uden brug af handskekasse (punkt 12 j), øges koncentrationen af natriumsufid i stamopløsningen til 2 g/l (fra 1 g/l). Natriumsulfid kan også tilsættes fra en passende stamopløsning gennem septum på de lukkede testkolber, eftersom denne fremgangsmåde vil mindske risikoen for iltning, så der opnås en slutkoncentration på 0,2 g/l. Alternativt kan der bruges titanium(III)citrat (punkt 17 b). Tilsæt det gennem septum på de lukkede testkolber til en koncentration på 0,8-1,0 mmol/l. Titanium(III)citrat er et meget effektivt reduktionsmiddel med lav toksicitet, der fremstilles som følger: Opløs 2,94 g trinatriumcitratdihydrat i 50 ml iltfrit fortyndingsvand (punkt 14) (hvilket giver en opløsning på 200 mmol/l), og tilsæt 5 ml af en opløsning af titanium(III)chlorid (15 g/100 ml fortyndingsvand). Neutraliser til pH 7 ± 0,5 med natriumcarbonat, og hæld i en passende serumflaske med en strøm af kvælstofgas. Koncentrationen af titanium(III)citrat i denne stamopløsning er på 164 mmol/l. Brug testsubstratet med det samme, eller opbevar det ved 4 °C i højst en dag.

A.12 b) 10-dobbelt koncentreret testsubstrat fremstillet med følgende:

vandfrit kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(eller 11,2 g dodecahydrat)	5,3 g
ammoniumchlorid (NH_4Cl)	

▼**M6**

calciumchloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnesiumchloridhexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
jern(II)chloridtetrahydrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (redoxindikator)	0,01 g
natriumsulphidnonahydrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(eller titanium(III)citrat) slutkoncentration	0,8-1,0 mmol/l
opløsning af sporstoffer (se punkt 17 c, A.13)	10,0 ml
gærekstrakt	100 g
Opløses i fortyndingsvand (punkt 14) og fortyndes til:	1 000 ml

A.13 c) Opløsning af sporstoffer fremstillet med følgende:

mangan(II)chloridtetrahydrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborsyre (H_3BO_3).	0,05 g
zinkchlorid ($ZnCl_2$)	0,05 g
kobber(II)chlorid ($CuCl_2$)	0,03 g
natriummolybdatdihydrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
cobalt(II)chloridhexahydrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikkel(II)chloridhexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Opløses i fortyndingsvand (punkt 14) og fortyndes til:	1 000 ml«

A.14 Punkt 25: Indledende test

Det er vigtigt, at der gennemføres en indledende test som beskrevet i punkt 24, bortset fra at koncentrationen af slamfaststoffer skal være en hundredel af det oplyste, dvs. 0,1 g/l, 0,2 g/l og 0,4 g/l. Varigheden af inkubationen skal være mindst syv dage.

Bemærk: I ringtesten (5) var headspacevolumenet alt for højt, nemlig 75 % af det samlede volumen; det skal ligge inden for det anbefalede interval på 10-40 %. Det relevante kriterium er, at det producerede volumen gas ved en inhibering på ca. 80 % skal kunne måles med tilstrækkelig præcision (f.eks. ± 5 % til ± 10 %).

A.15 Punkt 26-30: Tilsætning af testkemikalie, inokulum og substrat

Tilsætningen foregår på samme måde som beskrevet i disse punkter, men substratopløsningen (punkt 17) erstattes af testsubstratet plus gærekstraktsubstrat (A.11).

Slutkoncentrationen af tørre slamfaststoffer reduceres desuden fra 2-4 g/l til 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). To eksempler på tilsætning af komponenter til testblandingen fremgår af tabel A.1, som erstatter tabellen i punkt 29.

A.16 Stk. 33: Inkubering af kolber

På grund af den forventede lavere gasproduktionshastighed skal inkubationsperioden være på mindst syv dage.

▼**M6**

A.17 Punkt 34: Trykmålinger

Der bruges samme fremgangsmåde til måling af trykket i kolbernes headspace som beskrevet i punkt 34, hvis mængderne i gasfasen skal angives. Hvis de samlede mængder CO_2 plus CH_4 skal måles, reduceres væskefasens pH-værdi til ca. 2 ved indsprøjtning af H_3PO_4 i hver relevant koble og måling af trykket efter 30 minutters omrystning ved testtemperaturen. Der kan dog opnås flere oplysninger om inokulummets kvalitet ved at måle trykket i hver kolbe før og efter tilsætning af syre. Hvis CO_2-produktionen f.eks. er langt højere end methanproduktionen, kan de gærende bakteriers følsomhed have ændret sig, og/eller det er fortrinsvis de methandannende bakterier, der påvirkes af testkemikaliet.

A.18 Punkt 36: pH-måling

Hvis der skal bruges H_3PO_4, vil nogle ekstra kolber, hvortil der ikke tilsættes H_3PO_4, skulle opstilles specifikt til pH-målingen.

HENVISNING:

T. Madsen, H. B. Rasmussen og L. Nilsson (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals, Project No.336, Vandkvalitetsinstituttet, Miljøstyrelsen, København, Danmark.

Tabel A.1.

Eksempler på testopstilling for testpartier

Bestanddele i reaktionsblandingen	Eksempel 1	Eksempel 2	Normal tilsætnings-rækkefølge
Koncentration af fremstillet inokulum (g/l)	0,42	2,1	—
Volumen tilsat inokulum (ml)	45	9	4
Koncentration af inokulum i testkolber (g/l)	0,20	0,20	—
Volumen tilsat testsubstrat (ml)	9	9	2
Volumen tilsat fortyndingsvand (ml)	36	72	3
Koncentration af gærekstrakt i testkolber (g/l)	9,7	9,7	—
Volumen stamopløsning af testkemikalie (ml)	3	3	1
Samlet volumen væske (ml)	93	93	—

▼**M6**

Tillæg 5

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M6

C.35. TOKSICITETSTEST — SEDIMENT/VAND PÅ *LUMBRICULUS* MED FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 225 (2007). Endobentiske sedimentædere risikerer potentielt høj eksponering for sedimentbundne kemikalier og bør derfor være genstand for særlig fokus, f.eks. (1), (2), (3). Blandt disse sedimentædere spiller akvatiske oligochaeter en vigtig rolle i akvatiske systemers sedimenter. Ved bioturbation af sedimentet og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af sådanne kemikalier for andre organismer, f.eks. bentivore fisk. I modsætning til epibentiske organismer, graver endobentiske akvatiske oligochaeter (f.eks. Lumbriculus variegatus) sig ned i sedimentet og indtager sedimentpartikler under sedimentoverfladen. Dermed eksponeres testorganismerne for testkemikaliet via alle mulige optagelsesveje (f.eks. kontakt med og indtagelse af forurenede sedimentpartikler, men også via porevand og overliggende vand).

2. Denne testmetode har til formål at vurdere virkningerne af længerevarende eksponering af den endobentiske oligochaet Lumbriculus variegatus (Müller) for sedimentassocierede kemikalier. Den er baseret på eksisterende testprotokoller for sedimenttoksicitet og bioakkumulering, f.eks. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoden er beskrevet for statiske testbetingelser. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af sediment med testkemikaliet. Brug af spiket sediment skal simulere et sediment, der er forurenet med testkemikaliet.

3. Kemikalier, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad flere veje. Den relative betydning af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af det pågældende kemikalies fysisk-kemiske egenskaber og dets skæbne i dyret i sidste ende. Ved stærkt adsorberende kemikalier (f.eks. med log K_{ow} > 5) eller ved kemikalier, der bindes kovalent til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere sådanne kemikaliers toksicitet, tilsættes det foder, der er nødvendigt for testorganismens reproduktion og vækst, til sedimentet inden tilsætning af testkemikaliet (11). Den beskrevne testmetode er tilstrækkeligt detaljeret til, at testen kan gennemføres, og samtidig er der mulighed for tilpasninger til forsøgsdesignet afhængigt af betingelserne i de enkelte laboratorier og testkemikaliernes forskellige egenskaber.

4. Testmetoden har til formål at bestemme et testkemikalies virkning på testorganismernes reproduktion og biomasse. De målte biologiske parametre er det samlede antal overlevende orme og biomassen (tørvægt) ved afslutningen af eksponeringsperioden. Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel, for at anslå den koncentration der vil have en effekt på x % (f.eks. EC_{50}, EC_{25} og EC_{10}), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme nuleffektkoncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC).

5. Kapitel C.27 i dette bilag, »Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet sediment« (6), indeholder mange vigtige og nyttige oplysninger om anvendelse af den præsenterede testmetode for toksicitet i sediment. Dette dokument dannede således udgangspunkt for de nødvendige ændringer med henblik på gennemførelse af toksicitetstest i sediment med Lumbriculus variegatus. Der henvises desuden bl.a. til ASTM Standard

▼M6

Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), the U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) og ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). Praktisk erfaring fra ringtest af testmetoden ((13), ringtestrapport) og oplysninger fra litteraturen var desuden vigtige kilder til information ved udarbejdelsen af dette dokument.

BETINGELSER OG RETNINGSLINJER

6. Oplysninger om testkemikaliet, såsom sikkerhedsforanstaltninger, korrekte opbevaringsbetingelser og analysemetoder, bør indhentes, før undersøgelsen indledes. For kemikalier, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der vejledning i (14).

7. Før en test gennemføres, skal der foreligge følgende oplysninger om testkemikaliet:

— generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed

— damptryk

— vandopløselighed.

8. Det vil være hensigtsmæssigt at have følgende supplerende oplysninger, inden testen påbegyndes:

— octanol/vand-fordelingskoefficient, K_{ow}

— organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient, udtrykt som K_{oc}

— hydrolyse

— fototransformation i vand

— bionedbrydelighed

— overfladespænding.

9. Oplysninger om visse egenskaber for det sediment, der skal bruges, bør indhentes, inden testen påbegyndes (7). Nærmere oplysninger findes i punkt 22-25.

PRINCIP FOR TESTEN

10. Orme i ensartet fysiologisk tilstand (synkroniseret som beskrevet i tillæg 5) eksponeres for en serie koncentrationer af giftstof tilsat til sedimentfasen i et sediment- og vandsystem. Der bør bruges syntetisk sediment og rekonstitueret vand som substrater. Testbeholdere uden tilsat testkemikalie fungerer som kontroller. Testkemikaliet tilsættes sedimentet samlet for hvert koncentrationsniveau for at minimere variabiliteten mellem replikater af hvert koncentrationsniveau, og testorganismerne anbringes derefter i testbeholderne, hvori sediment- og vandkoncentrationerne er blevet ækvilibreret (se punkt 29). Testdyrene eksponeres for sediment- og vandsystemerne i en periode på 28 dage. I lyset af det syntetiske sediments lave næringsstofindhold bør sedimentet justeres med en fødekilde (se punkt 22-23 og tillæg 4), for at sikre at ormene vokser og formerer sig under kontrolbetingelserne. På den måde sikres det, at testdyrene eksponeres gennem vandet og sedimentet såvel som gennem deres føde.

11. Det foretrukne endepunkt for denne type undersøgelse er EC_x (f.eks. EC_{50}, EC_{25} og EC_{10}; effektkoncentration, som har indvirkning på x % af testorganismerne) for henholdsvis reproduktion og biomasse sammenlignet med kontrollen. Det skal dog bemærkes, at EC_{50} betragtes som det stærkeste endepunkt som følge af den store usikkerhed, der er forbundet med lav

▼M6

EC_x (f.eks. EC_{10}, EC25) med ekstremt høje 95 % konfidensgrænser (f.eks. (15)), og den statistiske styrke, der beregnes under hypotesetesten. Derudover kan nuleffektkoncentrationen (NOEC) og den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) beregnes for biomasse og reproduktion, hvis testdesign og -data giver mulighed for at foretage disse beregninger (se punkt 34-38). Testdesignet afhænger af formålet med undersøgelsen, dvs. beregning af EC_x eller NOEC.

REFERENCETEST

12. De resultater, der opnås med kontrolorganismerne, forventes at være tilstrækkelig dokumentation for, at laboratoriet er i stand til at gennemføre testen, og — såfremt der foreligger historiske data — for testens repeterbarhed. Derudover kan referencetoksicitetstest gennemføres med regelmæssige mellemrum med et referencegiftstof for at vurdere testorganismernes følsomhed. 96 timers referencetoksicitetstest i vand alene er tilstrækkeligt til at dokumentere testdyrenes følsomhed og tilstand (4)(7). Oplysninger om pentachlorphenols (PCP) toksicitet i fuldstændige test (28 dages eksponering for spiket sediment) fremgår af tillæg 6 og af rapporten om ringtesten af testmetoden (13). PCP's akutte toksicitet i vand alene er f.eks. beskrevet i (16). Disse oplysninger kan bruges til at sammenligne testorganismers følsomhed i referencetest med PCP som referencegiftstof. Kaliumchlorid (KCl) eller kobbersulphat ($CuSO_4$) er blevet anbefalet som referencegiftstoffer med L. variegatus (4)(7). På nuværende tidspunkt er det vanskeligt at fastlægge kvalitetskriterier på grundlag af toksicitetsdata for KCl, da der mangler data i litteraturen om L. variegatus. Oplysninger om kobbers toksicitet for L. variegatus kan findes i (17)-(21).

TESTENS VALIDITET

13. Hvis en test skal være gyldig, skal følgende betingelser være opfyldt:

— En ringtest (13) har vist, at for Lumbriculus variegatus skal det gennemsnitlige antal levende orme pr. replikat i kontrollerne mindst være steget med en faktor 1,8 ved afslutningen af eksponeringsperioden i forhold til antal orme pr. replikat i begyndelsen af eksponeringsperioden.

— Det overliggende vands pH-værdi bør være på 6-9 under hele testen.

— Iltkoncentrationen i det overliggende vand må ikke være på under 30 % af luftmætningsværdien (ASV) ved testtemperaturen under testen.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testsystem

14. Et statisk system uden udskiftning af det overliggende vand anbefales. Hvis sediment/vand-forholdet (se punkt 15) er korrekt, vil forsigtig beluftning normalt være tilstrækkeligt til at holde vandkvaliteten på et acceptabelt niveau for testorganismerne (f.eks. maksimere niveauerne af opløst ilt og minimere opbygning af ekskretionsprodukter). Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med periodisk eller kontinuerlig udskiftning af det overliggende vand bør kun bruges i særlige tilfælde, eftersom løbende udskiftning af det overliggende vand må forventes at påvirke kemikaliets ligevægt (f.eks. tab af testkemikalie fra testsystemet).

Testbeholdere og -apparatur

15. Eksponeringen bør foregå i 250 ml-glasbægre, der måler 6 cm i diameter. Andre egnede glasbeholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sedimentet. Hver beholder bør indeholde et lag af formuleret sediment på ca. 1,5-3 cm. Forholdet

▼M6

mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Beholderne skal have en passende kapacitet i forhold til belastningsgraden, dvs. det antal orme, der tilsættes pr. vægtenhed sediment (se også punkt 39).

16. Testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testkemikalierne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inert materiale. Det skal sikres, at ingen dele af udstyret indeholder materialer, som kan opløses, absorbere testkemikalierne eller afgive andre kemikalier og have en skadelig virkning på testorganismerne. Der bør bruges polytetrafluorethylen (PTFE), rustfrit stål og/eller glas til alt udstyr, der kommer i berøring med testsubstraterne. Det kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas til organiske kemikalier, der har vist sig at adsorbere til glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug.

Testarter

17. De testarter, der bruges til denne type undersøgelse er ferskvandsoligochaeten Lumbriculus variegatus (Müller). Denne art er tolerant over for en lang række sedimenttyper og bruges i vid udstrækning til testning af sedimenttoksicitet og bioakkumulering [f.eks. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Testdyrenes oprindelse, bekræftelsen af arternes identitet (f.eks. (36)) og dyrkningsbetingelserne oplyses i rapporten. Identifikation af arten kræves ikke før hver test, hvis organismerne kommer fra en intern bestand.

Dyrkning af testorganismer

18. For at have et tilstrækkeligt antal orme til at gennemføre toksicitetstest i sediment bør ormene holdes i en permanent laboratoriekultur. Vejledning i laboratoriedyrkningsmetoder for Lumbriculus variegatus og kilder til starterkulturer er anført i tillæg 5. Oplysninger om dyrkning af denne art findes i (3), (7), (27).

19. For at sikre at testen gennemføres med dyr af samme art, anbefales det på det kraftigste at etablere kulturer med kun en art. Sørg for, at kulturerne og især de orme, der bruges i testen, er fri for synlige sygdomme eller misdannelser.

Vand

20. Kunstigt fremstillet ferskvand i henhold til kapitel C.1 i dette bilag (37) anbefales til brug som overliggende vand i testene; det kan også bruges til laboratoriekulturerne med ormene (oplysninger om klargøring findes i tillæg 2). Der kan om nødvendigt bruges råvand. Det valgte vand skal være af en sådan kvalitet, at testarten vokser og formerer sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at dens udseende eller adfærd bliver unormal. Lumbriculus variegatus har vist sig at overleve, vokse og formere sig i denne type vand (30), og der opnås maksimal standardisering af test- og kulturbetingelser. Hvis der bruges rekonstitueret vand, anføres sammensætningen heraf i rapporten, og vandet bør inden brug karakteriseres i det mindste med pH-værdi, iltindhold og hårdhed (udtrykt som mg $CaCO_3$/l). En analyse af vandet for mikroforurenere før brug kan give nyttige oplysninger (se f.eks. tillæg 3).

21. Det overliggende vands pH skal ligge i intervallet 6,0-9,0 (se punkt 13). Hvis der forventes øget udvikling af ammoniak, bør pH holdes mellem 6,0 og 8,0. Ved testning af f.eks. svage organiske syrer tilrådes det at justere pH ved at tilsætte buffer til det vand, der skal bruges i testen, jf. f.eks. (16). Hårdheden for det vand, der skal bruges i testen, bør være på 90-300 mg $CaCO_3$ pr. liter for råvand. I tillæg 3 sammenfattes de øvrige kriterier for acceptabelt fortyndingsvand i henhold til OECD Guideline 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Da uforurenede naturlige sedimenter fra en bestemt kilde måske ikke er tilgængelige hele året, og da hjemmehørende organismer og tilstedeværelsen af mikroforurenere kan påvirke testen, anbefales det at bruge et formuleret sediment (også kaldet kunstigt fremstillet eller syntetisk sediment). Brug af et formuleret sediment minimerer testbetingelsernes variabilitet og tilførsel af hjemmehørende fauna. Følgende formulerede sediment er baseret på det syntetiske sediment i (6), (39) og (40). Det anbefales til brug i denne type test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

a) 4-5 % (tørvægt) sphagnum; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv — nedbrydningsgrad: »middel« — findelt (partikelstørrelse ≤ 0,5 mm) og kun lufttørret.

b) 20 % ± 1 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit.

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (finsand af en partikelstørrelse på ≤ 2 mm, men > 50 % af partiklerne skal være 50-200 μm).

d) Deioniseret vand, 30-50 % af sediment (tørvægt), ud over de tørre sedimentkomponenter.

e) Kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at justere pH-værdien i den færdige sedimentblanding.

f) Det samlede organiske kulstofindhold (TOC) i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %) af sedimentet (tørvægt) og justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

g) Foder, f.eks. pulveriserede blade af brændenælde (Urtica sp., i overensstemmelse med farmaceutiske standarder, til konsum), eller en blanding af pulveriserede blade af brændenælde og α-cellulose (1: 1), 0,4-0,5 % af sedimentet (tørvægt), ud over de tørre sedimentkomponenter; flere oplysninger findes i tillæg 4.

23. Oprindelsen af tørv, kaolinler, fodermateriale og sand skal være kendt. Ud over litra g) indeholder kapitel C.27 i dette bilag (6) en liste over andre plantematerialer, der kan bruges som næringskilde: tørrede blade af morbær (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens), spinat (Spinacia oleracea) eller korngræs.

24. Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Den valgte fødekilde bør som minimum give mulighed for acceptabel reproduktion i kontrollerne. En analyse af det syntetiske sediment eller dets bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger. Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 4. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret (se også punkt 25 og tillæg 4). Det syntetiske sediment bør som minimum karakteriseres ved bestanddelenes oprindelse, kornstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), samlet organisk kulstofindhold (TOC), vandindhold og pH. Måling af redoxpotentiale er valgfri.

25. Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlige sedimenter fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssediment (3). Hvis naturligt sediment anvendes, skal det dog som minimum karakteriseres med oprindelse (udtagningssted), pH og ammoniak i porevandet, samlet organisk kulstofindhold (TOC) og kvælstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og vandindhold i procent (7), og det bør

▼M6

være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde testorganismerne. Måling af redoxpotentiale og kationbytningskapacitet er valgfri. Inden naturligt sediment tilsættes testkemikaliet, bør det desuden konditioneres i syv dage, under de betingelser der anvendes i den efterfølgende test. Ved udløbet af denne konditioneringsperiode fjernes og kasseres det overliggende vand.

26. Det anvendte sediment skal være af en sådan kvalitet, at kontrolorganismerne overlever og formerer sig i eksponeringsperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Kontrolormene bør grave sig ned i sedimentet og indtage det. Reproduktionen i kontrollerne skal som minimum opfylde validitetskriterierne i punkt 13. Tilstedeværelsen eller fraværet af fækale pellets på sedimentoverfladen, som indikerer, at ormene indtager sedimentet, registreres og kan være nyttig ved fortolkningen af testresultaterne med hensyn til eksponeringsveje. Der kan opnås yderligere oplysninger om indtagelse af sediment ved anvendelse af de metoder, der er beskrevet i (24), (25), (44) og (45), som indeholder nærmere oplysninger om indtagelse af sediment og partikelselektion i testorganismerne.

27. Procedurer for håndtering af naturlige sedimenter inden brug i laboratoriet er beskrevet i (3), (7) og (12). Den procedure for klargøring og opbevaring af syntetisk sediment, det anbefales at bruge i Lumbriculus-testen, er beskrevet i tillæg 4.

Tilsætning af testkemikaliet

28. Testkemikaliet skal tilsættes til sedimentet. Da de fleste testkemikalier forventes at have lav vandopløselighed, bør de opløses i et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone, n-hexan, cyclohexan) i et så lille volumen som muligt for at klargøre stamopløsningen. Stamopløsningen fortyndes med det samme opløsningsmiddel for at klargøre testopløsningerne. Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af testkemikaliet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af et egnet opløsningsmiddel. Der skal bruges samme volumen af den tilsvarende opløsning til hvert koncentrationsniveau. Den samlede mængde kemikalie tilsættes til sedimentet for hvert koncentrationsniveau for at minimere variabiliteten mellem testkemikaliekoncentrationen i de enkelte replikater. Hver af testopløsningerne blandes dernæst med kvartssand som beskrevet i punkt 22 (f.eks. 10 g kvartssand pr. testbeholder). Det har vist sig, at et volumen på 0,20-0,25 ml pr. g sand er tilstrækkeligt til at gennembløde kvartssandet helt. Derefter skal opløsningsmidlet inddampes til tørhed. For at minimere tab af testkemikalie ved co-inddampning (f.eks. afhængigt af kemikaliets damptryk) skal det coatede sand bruges umiddelbart efter tørring. Det tørre sand blandes med en passende mængde formuleret sediment med et tilsvarende koncentrationsniveau. Den mængde sand, der findes i testkemikalie/sand-blandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sedimentet skal således fremstilles med mindre sand). Den største fordel ved denne fremgangsmåde er, at der stort set ikke tilsættes noget opløsningsmiddel til sedimentet (7). Alternativt, f.eks. ved sediment fra marker, kan testkemikaliet tilsættes ved spiking af en tørret og findelt del af sedimentet som beskrevet ovenfor for kvartssand eller ved omrøring af testkemikaliet i det våde sediment, med efterfølgende afdampning af eventuelt opløsningsmiddel. Det skal sikres, at det testskemikalie, der tilsættes sedimentet, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bekræfte målkoncentrationerne i sedimentet og bestemme graden af homogenitet. Det kan også være nyttigt at analysere delprøver af testopløsningerne for at bekræfte målkoncentrationerne i sedimentet. Eftersom der bruges et opløsningsmiddel til at belægge kvartssandet med testkemikaliet, bør der anvendes en opløsningsmiddelkontrol, som er fremstillet med samme

▼M6

mængde opløsningsmiddel som testsedimenterne. Den anvendte spiking-metode og årsagerne til at vælge en anden spiking-metode, end den der er beskrevet ovenfor, skal anføres i rapporten. Spiking-metoden kan tilpasses til testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. for at forhindre tab som følge af fordampning under spiking eller ækvilibrering. Supplerende vejledning om spiking-metoder findes i Environment Canada (1995) (46).

29. Når det spikede sediment er klargjort, fordelt i replikattestbeholderne og overhældt med testvand, afventes det, at testkemikaliet fordeler sig fra sedimentet til den vandige fase (f.eks. (3)(7)(9)). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger) (f.eks. (27)(47)). I denne test afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer til syv dage anbefales. På den måde minimeres testkemikaliets nedbrydningstid. Afhængigt af undersøgelsens formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan det spikede sediment ækvilibreres eller ældes i længere tid.

30. Efter denne ækvilibreringstid udtages der som minimum prøver af det overliggende vand og bulksedimentet, som minimum ved den højeste koncentration og en lavere koncentration, med henblik på analyse af testkemikaliekoncentrationen. Disse analytiske bestemmelser af testkemikaliet bør gøre det muligt at beregne massebalancen og angive resultater baseret på målte startkoncentrationer. Generelt forstyrrer eller ødelægger prøveudtagning sediment- og vandsystemet. Derfor er det normalt ikke muligt at bruge de samme replikater til prøveudtagning af sediment og orme. Der skal opstilles yderligere »analysebeholdere« med passende dimensioner, som behandles på samme måde (herunder tilstedeværelsen af testorganismer), men som ikke bruges til biologiske observationer. Der vælges dimensioner for beholderne, der giver de prøvemængder, som er påkrævet i henhold til analysemetoden. Nærmere oplysninger om prøveudtagning er beskrevet i punkt 53.

UDFØRELSE AF TESTEN

Indledende test

31. Hvis der ikke foreligger oplysninger om testkemikaliets toksicitet for Lumbriculus variegatus, kan det være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment for at bestemme det interval af koncentrationer, der skal testes i den endelige test, og optimere testbetingelserne for den endelige test. Til det formål anvendes en række vidt forskellige koncentrationer af testkemikaliet. Ormene eksponeres for hver koncentration af testkemikaliet i en periode (f.eks. 28 dage som i den endelige test), der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer; der kræves ingen replikater. Ormenes adfærd, f.eks. undgåelse af sediment, som kan skyldes testkemikaliet og/eller sedimentet, observeres og registreres under en indledende test. Koncentrationer på over 1 000 mg/kg sediment (tørvægt) bør ikke testes i den indledende test.

Endelig test

32. I den endelige test bør der mindst bruges og udvælges fem koncentrationer, f.eks. baseret på resultaterne af den indledende test til bestemmelse af dosisinterval (punkt 31) og som beskrevet i punkt 35, 36, 37 og 38.

▼M6

33. En kontrol (oplysninger om replikation findes i punkt 36, 37 og 38), som indeholder alle bestanddele undtagen testkemikaliet, benyttes ud over testserien. Hvis der bruges opløsningsmiddel til tilsætning af testkemikaliet, må det ikke have nævneværdig indvirkning på testorganismerne, hvilket kan afsløres ved en yderligere kontrol, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

Testdesign

34. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas ved hvert koncentrationsniveau samt antal orme pr. testglas. Design for beregning af EC_x, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest er beskrevet i punkt 35, 36, 37 og 38.

35. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Ekstrapolering langt under den laveste koncentration, der har indvirkning på testorganismerne, eller over den højeste testede koncentration bør undgås. Hvis der — i særlige tilfælde — foretages en sådan ekstrapolering, skal rapporten indeholde en fyldestgørende forklaring.

36. Hvis EC_x skal anslås, skal der testes mindst fem koncentrationer og mindst tre replikater for hver koncentration; det anbefales at bruge seks replikater til kontrollen eller — hvis en sådan anvendes — opløsningsmiddelkontrollen for at forbedre beregningen af kontrolvariabiliteten. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre koncentrationsresponskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med responser i intervallet 5-95 % forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen.

37. Hvis LOEC/NOEC-værdierne skal anslås, skal der bruges mindst fem testkoncentrationer med mindst fire replikater (det anbefales at bruge seks replikater til kontrollen eller — hvis en sådan anvendes — opløsningsmiddelkontrollen for at forbedre beregningen af kontrolvariabiliteten), og faktoren mellem koncentrationerne bør ikke overstige to. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.

38. Der kan gennemføres en grænsetest (med en testkoncentration og kontroller), hvis der ikke forventes nogen virkninger op til 1 000 mg/kg sediment (tørvægt) (f.eks. fra en indledende test til bestemmelse af dosisinterval), eller hvis testning ved en enkelt koncentration vil være tilstrækkelig til at bekræfte en interessant NOEC-værdi. I sidstnævnte tilfælde bør en detaljeret begrundelse for valg af grænsekoncentration fremgå af testrapporten. Formålet med grænsetesten er at udføre en test ved en koncentration, der er høj nok til, at beslutningstagere kan udelukke mulige toksiske virkninger af testkemikaliet, og grænsen fastsættes til en koncentration, der ikke forventes at forekomme under nogen omstændigheder. 1 000 mg/kg (tørvægt) anbefales. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgrupperne. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.

Eksponeringsbetingelser

Testorganismer

39. Testen udføres med mindst ti orme for hvert replikat, der anvendes til bestemmelse af biologiske parametre. Antallet af orme svarer til ca. 50-100 mg våd biomasse. Hvis det antages, at tørstofindholdet er på 17,1 % (48), giver det ca. 9-17 mg tør biomasse pr. beholder. U.S. EPA (2000 (7)) anbefaler at bruge en belastningsgrad, der ikke overstiger 1: 50 (tør

▼M6

biomasse: TOC). For det formulerede sediment, der er beskrevet i punkt 22, svarer det til ca. 43 g sediment (tørvægt) pr. ti orme ved et TOC-indhold på 2,0 % tørt sediment. I tilfælde hvor der bruges over ti orme pr. beholder, justeres mængden af sediment og overliggende vand tilsvarende.

40. De orme, der bruges i en test, skal alle komme fra samme kilde og skal være dyr i ensartet fysiologisk tilstand (se tillæg 5). Der bør vælges orme af samme størrelse (se punkt 39). Det anbefales, at man inden testen foretager et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af ormepartiet eller -bestanden.

41. De orme, der skal bruges i en test, fjernes fra kulturen (flere oplysninger findes i tillæg 5). Store (voksne) dyr, der ikke viser tegn på nylig fragmentering, flyttes til glasskåle (f.eks. petriskåle), som indeholder rent vand. De synkroniseres derefter som beskrevet i tillæg 5. Efter regenerering i en periode på 10-14 dage anvendes de intakte hele orme af samme størrelse, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne (f.eks. for så vidt angår temperatur, lysforhold og overliggende vand), bør en akklimatiseringsfase på f.eks. 24 timer med samme temperatur, lysforhold og overliggende vand som i testen være nok til at tilpasse ormene til testbetingelserne. De tilpassede oligochaeter bør fordeles vilkårligt i testbeholderne.

Fodring

42. Eftersom foder tilsættes til sedimentet inden (eller samtidig med) tilsætningen af testkemikaliet, fodres ormene ikke yderligere under testen.

Lys og temperatur

43. Lysperioden i kulturen og testen er normalt på 16 timer (3), (7). Lysintensiteten skal være lav (f.eks. 100-500 lux) for at imitere de naturlige forhold ved sedimentoverfladen og skal måles mindst en gang i eksponeringsperioden. Temperaturen skal være 20 °C ± 2 °C i hele testen. Temperaturforskellen mellem testbeholderne må ikke — på en given målingsdato — overstige ± 1 °C. Testbeholderne anbringes randomiseret i testinkubatoren eller testområdet, bl.a. for at minimere skævheder i reproduktionen som følge af beholderens placering.

Beluftning

44. Det overliggende vand i testbeholderen beluftes forsigtigt (f.eks. 2-4 bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt ca. 2 cm over sedimentoverfladen med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til under 30 % af luftmætningsværdien (ASV). Luftforsyningen skal kontrolleres og — om nødvendigt — justeres mindst en gang om dagen på arbejdsdage.

Målinger af vandkvaliteten

45. Følgende vandkvalitetsparametre måles i det overliggende vand:

Temperatur:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; temperaturen i det omgivende substrat (omgivende luft eller vandbad) kan, hvis det er muligt, desuden registreres f.eks. en gang i timen

▼M6

Opløst iltindhold:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; udtrykt som mg/l og % ASV (air saturation value — luftmætningsværdi)
Lufttilførsel:	kontrolleres mindst en gang om dagen på arbejdsdage og justeres om nødvendigt.
pH:	i mindst en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau og en kontroltestbeholder en gang om ugen og i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden
Vandets samlede hårdhed:	i mindst en kontrolreplikat og en testbeholder ved den højeste koncentration i begyndelsen og slutningen af eksponeringsperioden; udtrykt som mg/l $CaCO_3$
Samlet ammoniakindhold:	i mindst en kontrolreplikat og en testbeholder ved hvert koncentrationsniveau i begyndelsen af eksponeringsperioden og efterfølgende tre gange om ugen; udtrykt som mg/l NH_4^+ eller NH_3 eller total ammoniak-N.

Hvis måling af vandkvalitetsparametre kræver, at der fjernes større vandprøver fra beholderne, kan det være tilrådeligt at opstille særskilte beholdere til vandkvalitetsmålinger, således at der ikke ændres på volumenforholdet mellem vand og sediment.

Biologiske observationer

46. Under eksponeringen observeres testbeholderne med henblik på visuel vurdering af eventuelle adfærdsmæssige forskelle hos ormene (f.eks. undgåelse af sediment, synlige fækale pellets på sedimentoverfladen) i forhold til kontrollerne. Observationer registreres.

47. Ved afslutningen af testen undersøges hver replikat (yderligere beholdere, der skal underkastes kemisk analyse, kan udelukkes fra undersøgelsen). Der anvendes en passende metode til at opsamle alle ormene fra testbeholderen. Det skal sikres, at alle ormene opsamles, uden at de beskadiges. En metode kan være at sigte ormene fra sedimentet. Der kan bruges et net af rustfrit stål med passende maskestørrelse. Det meste af det overliggende vand dekanteres omhyggeligt, og det resterende sediment og vand omrystes til en opslæmning, der kan hældes gennem sigten. Med en maskestørrelse på 500 μm vil de fleste af sedimentpartiklerne passere sigten meget hurtigt; sigtningen bør dog ske hurtigt for at forhindre orme i at krybe ind i eller gennem nettet. En maskestørrelse på 250 μm vil forhindre ormene i at krybe ind i eller gennem nettet; det skal dog sikres, at så få sedimentpartikler som muligt forbliver på nettet. Den sigtede opslæmning fra hver replikatbeholder kan hældes gennem sigten endnu en gang, for at sikre at alle orme er opsamlet. En alternativ metode kan være at opvarme sedimentet ved at anbringe testbeholderne i et vandbad ved 50-60 °C; ormene vil forlade sedimentet og kan indsamles fra sedimentoverfladen med en flammepoleret pipette med bred åbning. En anden alternativ metode kan være at fremstille en sedimentopslæmning og hælde denne opslæmning ud i en lav skål af en passende størrelse. Ormene kan opsamles fra det lave lag opslæmning med en stålnål eller en urmagerpincet (som skal bruges mere som en gaffel end en pincet for at undgå at skade ormene) og overføres til rent vand. Når ormene er adskilt fra sedimentopslæmningen, skylles de i testsubstrat og tælles.

48. Uanset hvilken metode der bruges, skal laboratorier dokumentere, at deres personale gennemsnitligt kan opsamle mindst 90 % af organismerne fra alt

▼M6

sedimentet. Et vist antal testorganismer kan f.eks. tilsættes til kontrolsediment eller testsedimenter, hvorefter genfindingsgraden kan bestemmes efter en time (7).

49. Det samlede antal levende og døde individer pr. replikat registreres og vurderes. Følgende grupper af orme betragtes som døde:

a) der er ingen reaktion på en let, mekanisk påvirkning

b) der er tegn på nedbrydning (kombineret med litra a)

c) antallet af manglende orme

De levende orme kan tilhøre en af tre grupper:

a) store hele orme (voksne) uden regenererede kropsområder

b) hele orme med regenererede kropsområder med en lysere farve (dvs. med ny bagende, med ny forende eller med både ny forende og ny bagende)

c) ikke hele orme (dvs. orme, der er blevet delt for nylig, og som ikke har regenereret de manglende kropsområder)

Disse yderligere observationer er ikke obligatoriske, men kan bruges til yderligere fortolkning af de biologiske resultater (f.eks. kan et højere antal orme i gruppe c indikere forsinket reproduktion eller regenerering ved en given behandling). Hvis der observeres forskelle i udseende (f.eks. læsioner i de integumente, ødematiske kropsområder) mellem behandlede orme og kontrolorme, registreres disse.

50. Umiddelbart efter tælling/vurdering overføres de levende orme, der er fundet i hver replikat, til tørrede, forvejede og mærkede vægtskåle (en pr. replikat) og aflives med en dråbe ethanol pr. vægtskål. Vægtskålene anbringes i en tørreovn ved 100 °C ± 5 °C til tørring natten over, hvorefter de vejes efter afkøling i en ekssikkator, og ormenes tørvægt bestemmes (fortrinsvis i g, mindst fire decimaler).

51. Ud over den samlede tørvægt kan den askefri tørvægt bestemmes som beskrevet i (49) for at tage højde for uorganiske komponenter fra indtaget sediment i ormenes fordøjelseskanal.

52. Biomassen bestemmes som den samlede biomasse pr. replikat, herunder voksne orme og afkom. Døde orme tages ikke i betragtning ved bestemmelse af biomasse pr. replikat.

Kontrol af testkemikaliekoncentrationer

Prøveudtagning

53. Der udtages prøver til kemisk analyse af testkemikaliet som minimum ved den højeste koncentration og en lavere koncentration og som minimum ved afslutningen af ækvilibreringsfasen (inden tilsætning af testorganismerne) og ved afslutningen af testen. Der udtages som minimum prøver til analyse af bulksedimentet og det overliggende vand. Der udtages mindst to prøver pr. matrix og behandling på hver prøvetagningsdato. En af duplikatprøverne kan opbevares som reserve (f.eks. til analyse i tilfælde af at den oprindelige analyse afviger mere end 20 % fra den nominelle koncentration). Hvis der er

▼M6

tale om specifikke kemiske egenskaber, f.eks. hvis der forventes hurtig nedbrydning af testkemikaliet, kan analyseplanen justeres (f.eks. hyppigere prøveudtagning, analyse af flere koncentrationsniveauer) på baggrund af en ekspertvurdering. Der kan så udtages prøver på mellemliggende prøvetagningsdatoer (f.eks. på dag syv efter eksponeringens start).

54. Der udtages prøver fra det overliggende vand ved omhyggeligt at dekantere eller opsuge det overliggende vand med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet. Prøvernes volumen registreres.

55. Når det overliggende vand er fjernet, homogeniseres sedimentet, og det overføres til en passende beholder. Den våde sedimentprøves vægt registreres.

56. Hvis der er brug for yderligere analyse af testkemikaliet i porevandet, centrifugeres de homogeniserede og vejede sedimentprøver for at opsamle porevandet. Eksempelvis kan ca. 200 ml vådt sediment fyldes i 250 ml-centrifugebægre. Derefter centrifugeres prøverne uden filtrering for at isolere porevandet, f.eks. ved 10 000 ± 600 × *g* i 30-60 minutter ved en temperatur, der ikke overstiger testtemperaturen. Efter centrifugering dekanteres supernatanten, eller den pipetteres, idet det sikres, at der ikke indsamles sedimentpartikler, og volumenet registreres. Den tilbageværende sedimentpellets vægt registreres. Det kan lette vurderingen af massebalancen eller genfindingen af testkemikaliet i vand- og sedimentsystemet, hvis sedimentets tørvægt bestemmes på hver prøvetagningsdato. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

57. Foretages analyserne ikke med det samme, opbevares prøverne hensigtsmæssigt, f.eks. under de opbevaringsbetingelser, der anbefales for minimal nedbrydning af det specifikke testkemikalie (miljøprøver opbevares f.eks. almindeligvis ved – 18 °C i mørke). Der skal indhentes oplysninger om passende opbevaringsbetingelser for det specifikke testkemikalie — f.eks. opbevaringstid og -temperaur, ekstraktionsfremgangsmåder osv. — inden undersøgelsen indledes.

Analysemetode

58. Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af testkemikaliet i vand- og sedimentprøver for den valgte metode, som minimum ved de laveste og højeste testkoncentrationer. Det kontrolleres tillige, at testkemikaliet ikke kan påvises i kontrolkamrene i koncentrationer, som ligger over bestemmelsesgrænsen. Det kan være nødvendigt at korrigere de nominelle koncentrationer for genfinding af kvalitetskontrolspikes (f.eks. når genfindingsgraden overstiger 80-120 % af den tilsatte mængde). Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. som følge af adsorption af testkemikaliet til prøvetagningsudstyret) minimeres.

59. Genfindingen af testkemikalie, bestemmelsesgrænsen og detektionsgrænsen i sediment og vand registreres og anføres i rapporten.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

60. Testens vigtigste obligatoriske responsvariable, der skal vurderes statistisk, er biomassen og det samlede antal orme pr. replikat. Reproduktion (udtrykt som stigning i antal orme) og vækst (udtrykt som stigning i tør biomasse) kan også vurderes. I dette tilfælde gives et skøn over ormenes tørvægt i begyndelsen af eksponeringsperioden f.eks. ved måling af tørvægten for en repræsentativ delprøve af det parti synkroniserede orme, der skal bruges til testen.

▼M6

61. Dødelighed er ikke et endepunkt i denne test, men bør så vidt muligt vurderes. I forbindelse med vurderingen af dødeligheden betragtes de orme, der ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning, eller som udviser tegn på nedbrydning, samt de manglende orme som døde. Dødeligheden bør som minimum registreres og tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne.

62. Effektkoncentrationerne udtrykkes i mg/kg sediment (tørvægt). Hvis den målte genfinding af testkemikalie i sedimentet, eller i sediment og overliggende vand, i begyndelsen af eksponeringsperioden ligger på 80-120 % af de nominelle koncentrationer, kan effektkoncentrationerne (EC_x, NOEC, LOEC) udtrykkes på grundlag af nominelle koncentrationer. Hvis genfindingen afviger mere end 20 % fra de nominelle koncentrationer, bør effektkoncentrationerne (ECx, NOEC, LOEC) baseres på de oprindeligt målte koncentrationer i begyndelsen af eksponeringsperioden, f.eks. under hensyntagen til testkemikaliets massebalance i testsystemet (se punkt 30). I disse tilfælde kan der indhentes yderligere oplysninger fra analyse af stamopløsninger og/eller tilsatte opløsninger, for at bekræfte at testsedimenterne blev klargjort korrekt.

EC_x

63. EC_x-værdier for de parametre, der er beskrevet i punkt 60, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Karber-metoden eller simpel interpolation). Vejledning i statistisk analyse findes i (15) og (50). En EC_x-værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x-værdi skal middelværdierne for hver behandling ($\overline{X}$), underkastes en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

64. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Der bør anvendes passende statistiske metoder. Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrollen ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0,05$. Eksempler er angivet i nedenstående punkter. Vejledning i valg af passende statistiske metoder findes i (15) og (50).

65. Normalfordelingen af data kan f.eks. testes med Kolmogorov-Smirnovs goodness-of-fit-test, Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test) eller Shapiro-Wilk-testen (tosidet, $p \leq 0,05$). Cochrans test, Levenes test eller Bartletts test (tosidet, $p \leq 0,05$) kan bruges til at teste varianshomogeniteten. Hvis forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, varianshomogenitet) er opfyldt, kan der udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Parvise sammenligninger (f.eks. Dunnetts test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer. Ellers bør ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstra's trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

66. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandling), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons (samlet antal orme og biomasse udtrykt som ormenes tørvægt) vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt. Tillæg 6 indeholder oplysninger om den statistiske styrke, der blev opnået under hypotesetesten i forbindelse med ringtesten af testmetoden.

▼M6

67. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddelkontrol) kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrol- og opløsningsmiddelkontrolreplikater samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

Fortolkning af resultaterne

68. Hvis der blev afveget fra testmetoden, og hvis der i testkoncentrationer måles koncentrationer nær den anvendte analysemetodes detektionsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed. Eventuelle fravigelser af testmetoden skal oplyses.

Testrapport.

69. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— *Testkemikalie:*

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af testkemikaliet, testkemikaliets kilde og identitet og koncentration af eventuelt opløsningsmiddel.

— eventuelle oplysninger om de fysiske egenskaber og fysisk-kemiske egenskaber indhentet inden påbegyndelse af testen (f.eks. vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), log K_{ow}, stabilitet i vand osv.)

— *Testede arter:*

— videnskabeligt navn, herkomst, eventuel forbehandling, akklimatisering, dyrkningsbetingelser osv.

— *Testbetingelser:*

— den anvendte testmetode (f.eks. statisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)

— testdesign (f.eks. antal testkamre samt materiale og størrelse, vandvolumen pr. beholder, sedimentmasse og -volumen pr. beholder (ved gennemstrømningsprocedurer eller semistatiske procedurer: vandudskiftningsrate), eventuel beluftning før og under testen, antal replikater, antal orme pr. replikat i begyndelsen af eksponeringsperioden, antal testkoncentrationer, konditioneringsperiode, ækvilibrerings- og eksponeringsperioder, prøvetagningshyppighed)

— dybde af sediment og overliggende vand

— metode til forbehandling og tilsætning af testkemikalie

— nominelle testkoncentrationer, oplysninger om prøveudtagning med henblik på kemisk analyse og de analysemetoder, hvormed testkemikaliekoncentrationerne blev opnået

— sedimentets karakteristika som beskrevet i punkt 24-25 og eventuelle andre målinger, klargøring af formuleret sediment

— fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed og eventuelle andre målinger) inden påbegyndelse af testen

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed

▼**M6**

— lysintensitet og lysperiode(r)

— anvendte metoder til bestemmelse af alle biologiske parametre (f.eks. prøveudtagning, kontrol, vejning af testorganismer) og alle abiotiske parametre (f.eks. vand- og sedimentkvalitetsparametre)

— volumen og/eller vægt for alle prøver til kemisk analyse

— detaljerede oplysninger om, hvordan alle prøver til kemisk analyse er behandlet, herunder klargøring, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for testkemikaliet samt genfinding af testkemikaliet.

— *Resultater:*

— vandkvaliteten i testbeholderne (pH, temperatur, koncentration af opløst ilt, hårdhed, ammoniakkoncentrationer og eventuelle andre målinger)

— samlet organisk kulstofindhold (TOC), forhold mellem tørvægt og vådvægt, sedimentets pH og eventuelle andre målinger

— samlet antal og — hvis det er bestemt — antal hele og ikke hele orme i hvert testkammer ved afslutningen af testen

— tørvægt af ormene i hvert testkammer ved afslutningen af testen og — hvis den er målt — tørvægt af en delprøve af ormene ved begyndelsen af testen

— eventuel observeret unormal adfærd sammenlignet med kontrollerne (f.eks. undgåelse af sediment, tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets)

— eventuelle observerede dødsfald

— estimater for toksicitetsendepunkter (f.eks. EC_x, NOEC og/eller LOEC) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle foretagne analyser med henblik på at bestemme testkemikaliekoncentrationen i testbeholderne

— eventuelle afvigelser fra validitetskriterierne.

— *Evaluering af resultater:*

— resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i punkt 13

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

(1) EC (2003), Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I-IV, Kontoret for De Europæiske Fællesskabers Officielle Publikationer (Europa-Kommissionen), Luxembourg.

(2) OECD (1992a), Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment, OECD Monographs No. 60, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a, in: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002), Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00, i: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants, Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet sediment.

(7) U.S. EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, Second Edition, EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marts 2000.

(8) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, december 1997.

(9) I. R. Hill, P. Matthiessen og F. Heimbach (eds.) (1993), Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8.-10. november 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, redigeret af M. Streloke og H. Köpp, Berlin 1995.

(11) C. Riedhammer og B. Schwarz-Schulz (2001), The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment, J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004), Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates, American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003), Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___.

(16) A. Nikkilä, A. Halme og J. V. K. Kukkonen (2003), Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments, Chemosphere 51: 35-46.

(17) H. C. Baily og D. H. W. Liu (1980), *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism, s. 205-215, in: J. C. Eaton, P. R. Parrish og A. C. Hendricks (eds), Aquatic Toxicology, ASTM STP 707, American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) K. K. Chapman, M. J. Benton, R. O. Brinkhurst og P. R. Scheuerman (1999), Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test, Environmental Toxicology, 14(2): 271-278.

(19) J. S. Meyer, C. J. Boese og S. A. Collyard (2002), Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied, Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) M. K. Schubauer-Berigan, J. R. Dierkes, P. D. Monson og G. T. Ankley (1993), pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*, Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) C. W. West, V. R. Mattson, E. N. Leonard, G. L. Phipps og G. T. Ankley (1993), Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway, Hydrobiol. 262:57-63.

(22) C. G. Ingersoll, G. T. Ankley, D. A. Benoit, E. L. Brunson, G. A. Burton, F. J. Dwyer, R. A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King og P. V. Winger (1995), Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications, Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998a), Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing, Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998b), Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller), Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) P. F. Landrum, M. L. Gedeon, G. A. Burton, M. S. Greenberg og C. D. Rowland (2002), Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998), Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) C. G. Ingersoll, E. L. Brunson, N. Wang, F. J. Dwyer, G. T. Ankley, D. R. Mount, J. Huckins, J. Petty og P. F. Landrum (2003), Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*, Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) P. Rodriguez og T. B. Reynoldson (1999), Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment, in: A. Mudroch, J. M. Azcue og P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality, Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) M. Liebig, Ph. Egeler, J. Oehlmann og Th. Knacker (2005), Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment, Chemosphere 59, 271-280.

(31) K. Brust, O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann og R. Nagel (2001), Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams, Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, s. 2000-2007.

(32) M. Oetken, K.-U. Ludwichowski og R. Nagel (2000), Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marts 2000.

▼M6

(33) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998), Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller), Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) R. Dermott og M. Munawar (1992), A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller), Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) C. D. Drewes og C. R. Fourtner (1990), Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments, Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) R. O. Brinkhurst (1971), A guide for the identification of British aquatic oligochaeta, Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.

(38) OECD (1992c), Guidelines for Testing of Chemicals No. 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD, Paris.

(39) Ph. Egeler, J. Römbke, M. Meller, Th. Knacker, C. Franke, G. Studinger og R. Nagel (1997), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions, Chemosphere 35, 835-852.

(40) M. Meller, P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel og B. Streit (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Ph. Egeler, J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke og G. Studinger (1999), Workshop on »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) B. C. Suedel og J. H. Rodgers (1993), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) C. Naylor og C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) J. L. Kaster, J. V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski og M. E. Smith (1984), Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods, Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) M. Martinez-Madrid, P. Rodriguez, J. I. Perez-Iglesias og E. Navarro (1999), Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay, Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant, Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) P. F. Landrum (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*, Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) L. T. Brooke, G. T. Ankley, D. J. Call og P. M. Cook (1996), Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates, Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) D. R. Mount, T. D. Dawson og L. P. Burkhard (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*, Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

(50) OECD 2006, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, Frankrig.

(51) M. Liebig, M. Meller og P. Egeler (2004), Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*, Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests, 24.-25. marts 2004, BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107-119.

Supplerende litteratur om statistiske metoder:

C. W. Dunnett (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

C. W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

D. J. Finney (1971), Probit Analysis (3rd ed.), s. 19-76, Cambridge Univ. Press.

D. J. Finney (1978), D. J. Finney, Statistical Methods in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, London.

M. A. Hamilton, R. C. Russo og R. V. Thurston (1977), Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Berigtigelse: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

S. Holm (1979), A simple sequentially rejective multiple test procedure, Scand. J. Statist. 6, 65-70.

R. R. Sokal og F. J. Rohlf (1981), Biometry. The principles and practice of statistics in biological research, 2nd edition. W. H. Freeman and Company, New York.

R. G. Miller Jr. (1986), Beyond ANOVA, basics of applied statistics, John Wiley & Sons, Inc., New York.

S. S. Shapiro og M. B. Wilk (1965), An analysis of variance test for normality (complete samples), Biometrika 52: 591-611.

D. A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

D. A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Konditioneringsperioden bruges til at stabilisere den mikrobielle komponent af sedimentet og fjerne f.eks. ammoniak fra sedimentets komponenter; den finder sted, inden testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Normalt kasseres det overliggende vand efter konditionering.

EC_x er den koncentration af testkemikaliet i sedimentet, der har x % (f.eks. 50 %) effekt på en biologisk parameter i løbet af en nærmere angivet eksponeringsperiode.

Ækvilibreringsperioden skal give mulighed for fordeling af testkemikaliet mellem den faste fase, porevandet og det overliggende vand; den finder sted efter tilsætning af testkemikaliet til sedimentet og inden tilsætning af testorganismerne.

Eksponeringsfasen er det tidsrum, hvori testorganismerne eksponeres for testkemikaliet.

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske komponenter i naturligt sediment.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant toksisk virkning ($p \leq 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en virkning, der mindst svarer til den, som iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p \leq 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode.

Octanol/vand-fordelingskoefficient (K_{ow}; også betegnet P_{ow}) er forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt og er et udtryk for et kemikalies lipofilicitet (kapitel A.24 i dette bilag). K_{ow} eller logaritmen for K_{ow} (log K_{ow}) benyttes som rettesnor for et kemikalies potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

Organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient (K_{oc}) er forholdet mellem et kemikalies koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i sediment og kemikaliets koncentration i vand ved ligevægt.

Overliggende vand er det vand, der dækker sedimentet i testbeholderen.

Porevand eller interstitielt vand er det vand, der optager pladsen mellem sediment eller jordpartikler.

Spiket sediment er sediment, som er tilsat testkemikalie.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼**M6**

Tillæg 2

Sammensætning af det anbefalede rekonstituerede vand

(jf. kapitel C.1 i dette bilag (1))

a) *Calciumchloridopløsning*

Opløs 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

b) *Magnesiumsulfatopløsning*

Opløs 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

c) *Natriumhydrogencarbonatopløsning*

Opløs 2,59 g $NaHCO_3$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

d) *Kaliumchloridopløsning*

Opløs 0,23 g KCl i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Det destillerede eller deioniserede vands ledningsevne må ikke overstige 10 μScm^{-1}.

25 ml af hver af opløsningerne a)-d) blandes, og der fortyndes til et samlet volumen på 1 l med deioniseret vand. Summen af calcium- og magnesiumioner i disse opløsninger er 2,5 mmol/l.

Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1, og forholdet mellem Na- og K-ioner er 10:1. Syrekapaciteten $K_{S4.3}$ i denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Fortyndingsvandet beluftes, indtil der er opnået iltmætning, og opbevares i ca. to dage uden yderligere beluftning inden brug.

HENVISNING

(1) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.

▼**M6**

Tillæg 3

Fysisk-kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

Komponent	Koncentrationer
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 µg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	< 50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider i alt + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Organisk chlor i alt	< 25 ng/l
(hentet fra OECD (1992) (1))	

HENVISNING

(1) OECD (1992), Guidelines for Testing of Chemicals No. 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD, Paris.

▼M6

Tillæg 4

Anbefalet syntetisk sediment — vejledning i klargøring og opbevaring

Sedimentbestanddele

Bestanddel	Karakteristika	% sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum — nedbrydningsgrad: »middel« — uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 0,5 mm) og lufttørret	5 ± 0,5
Kvartssand	Kornstørrelse: ≤ 2 mm, men 50 % af partiklerne skal være 50-200 µm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinitindhold ≥ 30 %	20 ± 1
Fødekilde	f.eks. urtica-pulver (Folia urticae), blade fra Urtica dioica (brændenælde), findelt (partikelstørrelse ≤ 0,5 mm); i overensstemmelse med farmaceutiske standarder, til konsum; ud over tørt sediment	0,4-0,5 %
Organisk kulstof	Justeret ved tilsætning af tørv og sand	2 ± 0,5
Calciumcarbonat	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent, ud over tørt sediment	0,05-1
Deioniseret vand	Ledningsevne ≤ 10 µS/cm, ud over tørt sediment	30-50

Bemærk: Hvis der forventes høje ammoniakkoncentrationer, f.eks. hvis testkemikaliet har vist sig at hæmme nitrifikation, kan det være hensigtsmæssigt at erstatte 50 % af det kvælstofrige urtica-pulver med cellulose (f.eks. α-cellulosepulver, kemisk rent, partikelstørrelse ≤ 0,5 mm; (1)(2)).

Klargøring

Tørven lufttørres og formales til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i deioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 °C ± 2 °C, for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5-7,5 med $CaCO_3$. Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det dog være hensigtsmæssigt at holde sedimentets pH under 7,0 (f.eks. 6,0-6,5). Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det formulerede sediment konditioneres i syv dage under samme betingelser som i den efterfølgende test (f.eks. sediment/vand-forhold 1: 4, højde på sedimentlag som i testbeholderne), inden testkemikaliet tilsættes, dvs. at det overhældes med vand, som skal

▼M6

beluftes. Ved udløbet af konditioneringsperioden fjernes og kasseres det overliggende vand. Derefter blandes det spikede kvartssand med sedimentet for hvert behandlingsniveau, sedimentet fordeles i replikattestbeholderne og overhældes med testvandet. Derefter inkuberes beholderne under samme betingelser som i den efterfølgende test. Det er på dette tidspunkt, at ækvilibreringsperioden indledes. Det overliggende vand beluftes.

Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Den kan først blandes med tørvesuspensionen (se ovenfor). For omfattende nedbrydning af fødekilden inden tilsætningen af testorganismerne — f.eks. ved en lang ækvilibreringsperiode — kan dog undgås, ved at sørge for at tidsrummet mellem tilsætningen af foder og begyndelsen af eksponeringsperioden er så kort som muligt. For at sikre at foderet er spiket med testkemikaliet, blandes fødekilden senest med sedimentet på den dag, hvor testkemikaliet tilsættes til sedimentet.

Opbevaring

De tørre bestanddele i det syntetiske sediment lagres tørt og køligt eller ved stuetemperatur. Det klargjorte sediment, hvortil testkemikaliet er tilsat, bruges straks i testen. Prøver af spiket sediment kan opbevares under de betingelser, der anbefales for det pågældende testkemikalie, indtil analyse.

LITTERATUR

(1) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) M. Liebig, M. Meller og P. Egeler (2004), Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*, Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests, 24.-25. marts 2004, BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107-119.

▼M6

Tillæg 5

Dyrkningsmetoder for Lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta forekommer i ferskvandssedimenter og anvendes i vid udstrækning i økotoksikologisk testning. Den kan let dyrkes under laboratoriebetingelser. Dyrkningsmetoderne gennemgås nedenfor.

Dyrkningsmetoder

Dyrkningsbetingelser for Lumbriculus variegatus er detaljeret beskrevet i Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Nedenfor gives en kort sammenfatning af disse betingelser. En stor fordel ved L. variegatus er dens hurtige reproduktion, som giver en hurtigt stigende biomasse i bestande dyrket i laboratorier (f.eks. (1), (3), (4), (5)).

Ormene kan dyrkes i store akvarier (57-80 l) ved 23 °C med en lysperiode på 16 timers lys (100-1 000 lux) og otte timers mørke med dagligt udskiftet råvand (45-50 l pr. akvarium). Substratet klargøres ved at skære ublegede brune papirservietter i strimler, som derefter kan blandes med dyrkningsvand i nogle få sekunder, hvilket giver små stykker papirsubstrat. Dette substrat kan derefter bruges direkte i Lumbriculus-dyrkningsakvarierne ved at dække bunden af tanken eller kan opbevares frosset i deioniseret vand til senere brug. Nyt substrat i tanken vil generelt kunne holde sig i ca. to måneder.

Hver ormekultur startes med 500-1 000 orme og tilføres en 10 ml suspension, som indeholder 6 g startfoder til ørreder tre gange om ugen under udskiftnings- eller gennemstrømningsbetingelser. Statiske eller semistatiske kulturer bør modtage lavere fodermængder for at forhindre bakterie- og svampevækst.

Under disse betingelser fordobles antallet af individer i kulturen generelt på ca. 10-14 dage.

Alternativt kan Lumbriculus variegatus dyrkes i et system, der består af et lag kvartssand som det, der bruges til det syntetiske sediment (1-2 cm dybt), og rekonstitueret vand. Beholdere af glas eller rustfrit stål med en højde på 12-20 cm kan bruges som dyrkningsbeholdere. Vandet beluftes forsigtigt (f.eks. to bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt ca. 2 cm over sedimentoverfladen. For at forhindre akkumulering af f.eks. ammoniak udskiftes det overliggende vand mindst en gang om ugen ved hjælp af et gennemstrømningssystem eller manuelt. Oligochaeterne kan holdes ved stuetemperatur med en lysperiode på 16 timers lys (intensitet 100-1 000 lux) og otte timers mørke. I den semistatiske kultur (vandudskiftning en gang om ugen) fodres ormene med TetraMin to gange om ugen (f.eks. 0,6-0,8 mg pr. cm^2 sedimentoverflade), som kan tilsættes som en suspension af 50 mg TetraMin pr. ml deioniseret vand.

Lumbriculus variegatus kan fjernes fra kulturerne, f.eks. ved at overføre substrat med et finmasket net eller organismer med en flammepoleret glaspipette med bred åbning (ca. 5 mm i diameter) til et separat bæger. Hvis substrat føres med over i dette bæger, henstår bægeret, som indeholder orme og substrat, natten over under gennemstrømning, hvilket vil fjerne substratet fra bægeret, mens ormene bliver i bunden af beholderen. De kan derefter overføres til nye klargjorte dyrkningsbeholdere eller bearbejdes yderligere med henblik på testen som anført i (3) og (4) eller nedenfor.

Et afgørende spørgsmål, når der bruges L. variegatus i sedimenttest, er ormens forplantningsform (fragmentation eller regenerering, f.eks. (6)) Denne vegetative formering resulterer i to fragmenter, som ikke indtager føde i en vis periode, indtil hoved- eller haledelen er regenereret (f.eks. (7), (8)). Det betyder, at eksponering hos L. variegatus via indtagelse af forurenet sediment ikke finder sted kontinuerligt.

▼M6

Derfor bør der gennemføres en synkronisering for at minimere ukontrolleret reproduktion og regenerering og efterfølgende høj variation i testresultaterne. En sådan variation kan forekomme, når individer, der har fragmenteret sig og derfor ikke indtager føde i en periode, er mindre eksponeret for testkemikaliet end andre individer, der ikke fragmenterer sig under testen (9), (10), (11). 10-14 dage inden påbegyndelsen af eksponeringen fragmenteres ormene kunstigt (synkronisering). Store (voksne) orme, der fortrinsvis ikke viser tegn på nylig regenerering, udvælges til synkronisering. Disse orme kan anbringes på en glasplade i en dråbe dyrkningsvand og dissekeres i det mediane kropsområde med en skalpel. Bagenderne skal have samme størrelse. Bagender henstår herefter i en dyrkningsbeholder, der indeholder samme substrat som kulturen og rekonstitueret vand, så de kan regenerere nye hoveder inden eksponeringsperiodens start. Det er et tegn på, at nye hoveder er regenereret, når de synkroniserede orme graver sig ned i substratet (tilstedeværelse af nye hoveder kan bekræftes ved at undersøge en repræsentativ delprøve under binokulært mikroskop). Testorganismerne forventes derefter at være i ensartet fysiologisk tilstand. Det betyder, at når reproduktion ved regenerering forekommer hos synkroniserede orme under testen, forventes stort set alle dyr at være eksponeret for det spikede sediment i samme grad. Fodring af de synkroniserede orme sker, så snart ormene begynder at grave sig ned i substratet eller syv dage efter dissektion. Fodersystemet skal være sammenligneligt med fodersystemet for de almindelige kulturer, men det kan være hensigtsmæssigt at fodre de synkroniserede orme med samme fødekilde som i testen. Ormene holdes ved testtemperaturen på 20 °C ± 2 °C. Efter regenerering anvendes de intakte hele orme, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller rustfrie dentale sonder til håndtering af ormene.

Kilder til starterkulturer til Lumbriculus variegatus (adresser i USA hentet fra (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Tyskland

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Tyskland

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Tyskland

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

LITTERATUR

(1) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants, Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998), Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a, in: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Volume 11.05, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, Second Edition, EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, marts 2000.

(5) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) C. D. Drewes og C. R. Fourtner (1990), Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments, Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998a), Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing, Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998b), Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller), Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) K. Brust, O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann og R. Nagel (2001), Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams, Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, s. 2000-2007.

(10) M. Oetken, K.-U. Ludwichowski og R. Nagel (2000), Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV, By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marts 2000.

(11) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen (1998), Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller), Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Tillæg 6

Resume af ringtestens resultater

»Sedimenttest med Lumbriculus variegatus«

Tabel 1

Resultater af individuelle ringtestserier: Gennemsnitligt antal orme i kontrollerne og opløsningsmiddelkontrollerne ved afslutningen af testen; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

	gennemsnitligt antal orme i kontrollerne	SD	CV (%)	n	gennemsnitligt antal orme i opløsningsmiddelkontrollerne	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
Gennemsnits-værdi af sammenlignende laboratorietest	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min.	**16,3**				**15,0**			
maks.	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabel 2

Resultater af individuelle ringtestserier: Gennemsnitlig tørvægt af orme pr. replikat i kontrollerne og opløsningsmiddelkontrollerne ved afslutningen af testen; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

	samlet tørvægt af orme pr. replikat (kontroller)	SD	CV (%)	n	samlet tørvægt af orme pr. replikat (opløsnings-middelkontroller)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Gennem-snits-værdi af sammen-lignende laborato-rietest	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min.	**12,9**				**10,5**			
maks.	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabel 3

Toksicitet for PCP: Oversigt over endepunkter i ringtesten; gennemsnitsværdier af sammenlignende laboratorietest for EC50, NOEC og LOEC; SD = standardafvigelse; CV = variationskoefficient.

Biologisk parameter		Gennemsnitsværdi af sammenlignende laboratorietest (mg/kg)	min	maks	Faktor for sammenlignende laboratorie-test	SD	CV (%)	geometrisk middel-værdi (mg/kg)
antal orme i alt	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
samlet tørvægt af orme	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
dødelighed/ overlevelse	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reproduktion (forøgelse af antal orme pr. replikat)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
vækst (biomasse-forøgelse pr. replikat)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: laveste påviselige forskel (minimum detectable difference) i forhold til kontrolværdierne ved hypotesetest; mål for den statistiske styrke

HENVISNING

Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbejde med R. Nagel og B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. ROVMIDE (HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER) — FORMERINGSTEST I JORD

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 226 (2008). Denne testmetode er beregnet til vurdering af kemikaliers virkninger på reproduktionen hos rovmidearten Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer Canestrini (Acari: Laelapidae), idet den giver mulighed for vurdering af hæmningen af den specifikke bestands væksthastighed (1,2). Ved formeringsevne forstås her antal unger ved testperiodens afslutning. H. aculeifer repræsenterer et yderligere trofisk niveau for den art, for hvilken der allerede foreligger testmetoder. En formeringstest uden skelnen mellem og kvantificering af de forskellige trin i reproduktionscyklussen betragtes som hensigtsmæssig i forbindelse med denne testmetode. For kemiske stoffer med et andet eksponeringsscenarie end via jorden kan andre tilgange være hensigtsmæssige (3).

2. Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer betragtes som en relevant repræsentant for jordfauna og nærmere bestemt rovmider. Den findes i hele verden (5) og kan let indsamles og dyrkes i laboratorier. Tillæg 7 indeholder en sammenfatning af H. aculeifers biologi. Der foreligger baggrundsinformation om miders økologi og deres brug i økotoksikologisk testning (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) og (12).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Voksne hunner udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet blandet i jorden. Testen påbegyndes med ti voksne hunner pr. replikatbeholder. Der bruges ikke hanner i testen, da erfaringen har vist, at hunner parrer sig umiddelbart eller kort efter klækning fra deutonymfestadiet, hvis der er hanner til stede. Derudover ville anvendelse af hanner forlænge testen, hvilket ville gøre det nødvendigt at skelne mellem alderstrin. Parring er således ikke i sig selv en del af testen. Hunnerne tilføres til testen 28-35 dage efter starten af æglægningsperioden i synkroniseringen (se tillæg 4), da hunnerne på det tidspunkt allerede har parret sig og passeret fasen lige før æglægning. Testen slutter på dag 14 ved 20 °C efter tilførsel af hunnerne (dag 0), hvilket sikrer, at det første kontrolafkom kan nå deutonymfestadiet (se tillæg 4). For den primære målte variabel bestemmes antallet af unger pr. testbeholder og desuden antallet af overlevende hunner. Reproduktionen hos mider, der eksponeres for testkemikaliet, sammenlignes med reproduktionen hos mider i kontrollerne med henblik på at bestemme ECx (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) eller nuleffektkoncentrationen (NOEC) (definitioner er anført i tillæg 1), afhængigt af forsøgsdesign (se punkt 29). Tillæg 8 indeholder en oversigt over testplanen.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Testkemikaliets vandopløselighed, log K_{ow}, fordelingskoefficient mellem jord og vand og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord, såsom biotisk og abiotisk nedbrydning, er ønskelige.

5. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilførselsmåden for testkemikaliet variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft/vand-fordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

▼M6

TESTENS VALIDITET

6. Følgende kriterier skal være opfyldt i de ubehandlede kontroller, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:

— Den gennemsnitlige dødelighed blandt voksne hunner må ikke overstige 20 % ved forsøgets afslutning.

— Det gennemsnitlige antal unger pr. replikat (med ti voksne hunner) skal være mindst 50 ved testens afslutning.

— Variationskoefficienten beregnet for antal unger pr. replikat må ikke overstige 30 % ved den endelige tests afslutning.

REFERENCEKEMIKALIE

7. ECx og/eller NOEC for et referencekemikalie skal bestemmes, for at give sikkerhed for at laboratorietestbetingelserne er tilstrækkelige, og kontrollere, at testorganismernes respons ikke har ændret sig over tid. Dimethoat (CAS 60-51-5) er et egnet referencekemikalie, der har vist sig at have indvirkning på populationsstørrelsen (4). Borsyre (CAS 10043-35-3) kan bruges som alternativt referencekemikalie. Der er mindre erfaring med dette kemikalie. Der er to mulige design:

— Referencekemikaliet kan testes samtidig med bestemmelsen af hvert testkemikalies toksicitet ved en koncentration, som skal påvises på forhånd i en dosis/respons-undersøgelse, hvor antallet af unger reduceres med > 50 %. I dette tilfælde bør antallet af replikater være det samme som i kontrollerne (se punkt 29).

— Alternativt testes referencekemikaliet 1-2 gange om året i en dosis/respons-test. Antallet af koncentrationer og replikater og afstandsfaktoren varierer afhængigt af det valgte design (se punkt 29), men der bør opnås en respons på 10-90 % effekt (afstandsfaktor på 1,8). EC_{50} for dimethoat baseret på antal unger bør være på 3,0-7,0 mg aktivt stof/kg jord (tørvægt). Baseret på de resultater, der er opnået med borsyre hidtil, bør EC_{50} baseret på antal unger være på 100-500 mg/kg jord (tørvægt).

BESKRIVELSE AF TESTEN

Testbeholdere og -udstyr

8. Der bruges testbeholdere med en diameter på 3-5 cm (jordhøjde ≥ 1,5 cm) af glas eller et andet kemisk inert materiale og med et tætsluttende låg. Skruelåg foretrækkes, og beholderne beluftes i givet fald to gange om ugen. Alternativt kan der bruges låg, som tillader direkte gasudveksling mellem substratet og atmosfæren (f.eks. gaze). Eftersom fugtindholdet skal holdes tilstrækkeligt højt under testen, er det vigtigt at kontrollere hver testbeholders vægt under testen og om nødvendigt tilsætte vand. Det kan være særlig vigtigt, hvis der ikke anvendes skruelåg. Hvis der bruges en uigennemsigtig testbeholder, bør låget være fremstillet af et materiale, der giver adgang til lys (f.eks. kan låget være perforeret og gennemsigtigt), men som samtidig forhindrer miderne i at slippe ud. Testbeholderens størrelse og type afhænger af ekstraktionsmetoden (flere oplysninger findes i tillæg 5). Hvis der anvendes varmeekstraktion direkte på testbeholderen, kan der tilføjes et bundnet af en passende maskestørrelse (forseglet indtil ekstraktion), og jorddybden bør være tilstrækkelig til at sikre en temperatur- og fugtgradient.

▼M6

9. Der kræves normalt laboratorieudstyr, navnlig følgende:

— fortrinsvis glasbeholdere med skruelåg

— tørreskab

— stereomikroskop

— børster til overførsel af mider

— pH-meter og luxmeter

— egnede nøjagtige vægte

— passende udstyr til temperaturkontrol

— passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne er udstyret med låg)

— temperaturstyret inkubator eller lille rum

— ekstraktionsudstyr (se tillæg 5) (13)

— overlyspanel med lysstyring

— krukker til indsamling af udtagne mider.

Klargøring af den syntetiske jord

10. Der bruges syntetisk jord til denne test. Den syntetiske jord består af følgende komponenter (alle værdier baseret på tørmasse):

— 5 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel)

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

— ca. 74 % lufttørret industrielt sand (afhængigt af den nødvendige mængde $CaCO_3$), overvejende fint sand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm. Den nøjagtige mængde sand afhænger af mængden af $CaCO_3$ (se nedenfor), idet de til sammen skal ligge på 75 %.

— < 1,0 % calciumcarbonat ($CaCO_3$, pulveriseret, analysekvalitet) for at få en pH på 6,0 ± 0,5. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art (se bemærkning 1).

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde $CaCO_3$ vil afhænge af jordsubstratets komponenter og bestemmes ved at måle pH-værdien af delprøver umiddelbart før testen (14).

Bemærkning 2: Den syntetiske jords sphagnumindhold afviger fra andre testmetoder med jordorganismer, hvor der i de fleste tilfælde bruges 10 % sphagnum (f.eks. (15)). Ifølge EPPO (16) indeholder typisk landbrugsjord dog ikke over 5 % organiske materialer, og reduktionen af sphagnumindholdet afspejler således naturlig jords begrænsede muligheder for testkemikaliets sorption til organisk kulstof.

Bemærkning 3: Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlig jord fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssubstrat. Anvendes der naturlig jord, bør det dog som minimum karakteriseres ved oprindelse (indsamlingssted), pH, tekstur (partikelstørrelsesfordeling) og indhold af organisk materiale. Jordens type og navn i henhold til jordklassifikation bør oplyses, hvis disse oplysninger foreligger, og jorden skal være

▼M6

uden forurening. Hvis testkemikaliet er et metal eller organometal, bestemmes den naturlige jords kationbytningskapacitet (CEC) også. Der bør lægges særlig vægt på at opfylde validitetskriterierne, da der typisk er begrænsede oplysninger om naturlig jord.

11. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratorieblander). Til bestemmelse af pH anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid ($CaCl_2$) i forholdet 1:5 (se (14) og tillæg 3). Hvis jorden er mere syreholdig end det krævede område (se punkt 10), kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde $CaCO_3$. Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af mere af blandingen af de første tre komponenter i punkt 10, men uden $CaCO_3$.

12. Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 2. To til syv dage før testens start fugtes den tørre syntetiske jord på forhånd ved at tilsætte destilleret eller deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne. Vandindholdet justeres til 40-60 % af den maksimale vandholdende evne ved tilsætning af testkemikalieopløsningen og/eller ved tilsætning af destilleret eller deioniseret vand (se punkt 16-18). Jordens vandindhold bestemmes igen omtrentligt ved forsigtigt at presse jorden sammen i hånden. Hvis vandindholdet er korrekt, viser små vanddråber sig mellem fingrene.

13. Jordens fugtindhold bestemmes ved begyndelsen og afslutningen af testen ved tørring til konstant vægt ved 105 °C i overensstemmelse med ISO 11465 (17), og jordens pH bestemmes i overensstemmelse med tillæg 3 eller ISO 10390 (14). Disse målinger foretages i yderligere prøver uden mider, både fra kontroljorden og fra jordprøver med hver testkoncentration. Jordens pH bør ikke justeres, når testen vedrører sure eller basiske kemikalier. Fugtindholdet overvåges gennem hele testen ved at veje beholderne regelmæssigt (se punkt 20 og 24).

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

14. Den art, der bruges i testen, er Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer (Canestrini, 1883). Der skal bruges voksne hunmider, hentet fra en synkroniseret population, til at starte testen op. Mider tilføres, ca. 7-14 dage efter at de er blevet voksne, 28-35 dage efter starten af æglægningsperioden i synkroniseringen (se punkt 3 og tillæg 4). Kilden til miderne og leverandøren heraf samt vedligeholdelsen af laboratoriekulturen registreres. Hvis der holdes en laboratoriekultur, anbefales det, at artens identitet bekræftes mindst en gang om året. Et oplysningsskema fremgår af tillæg 6.

Klargøring af testkoncentrationer

15. Testkemikaliet blandes i jorden. Organiske opløsningsmidler, der bruges i forbindelse med behandling af jorden med testkemikaliet, udvælges på grundlag af deres lave grad af toksicitet for mider, og testen skal omfatte passende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 29).

Vandopløseligt testkemikalie

16. En opløsning af testkemikaliet klargøres i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Det anbefales at bruge en passende mængde vand for at opnå det nødvendige vandindhold, dvs. 40-60 % af den maksimale vandholdende evne (se punkt 12). Hver opløsning af testkemikaliet blandes grundigt med et parti forhåndsfugtet jord, før det tilsættes til testbeholderen.

▼M6

Vanduopløseligt testkemikalie

17. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliet opløses i det mindst mulige volumen af et egnet bærestof (f.eks. acetone). Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Når der bruges sådanne bærestoffer, skal alle testkoncentrationer og kontrollen indeholde samme minimumsmængde af bærestoffet. Bærestoffet sprøjtes på eller blandes med en lille mængde, f.eks. 10 g, fint kvartssand. Det samlede sandindhold i substratet korrigeres for denne mængde. Bærestoffet fjernes ved afdampning i et stinkskab i mindst en time. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes til den fugtede jord og blandes grundigt ved tilsætning af en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding overføres til testbeholderne. Bemærk, at visse opløsningsmidler kan være toksiske for mider. Det anbefales derfor at bruge en yderligere vandkontrol uden bærestoffet, hvis opløsningsmidlets toksicitet for mider ikke er kendt. Hvis det i tilstrækkelig grad er påvist, at opløsningsmidlet (i de koncentrationer, der skal anvendes) ikke har nogen effekt, kan vandkontrollen udelukkes.

Testkemikalie, der er tungtopløseligt i vand, og organiske opløsningsmidler

18. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes 2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder (f.eks. 10 g fint kvartssand til fire replikater) med testkemikaliet for at opnå den ønskede testkoncentration. Det samlede sandindhold i substratet korrigeres for denne mængde. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes til den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en passende kontrolgruppe.

FREMGANGSMÅDE

Testgrupper og kontrolgrupper

19. Det anbefales at bruge ti voksne hunner i 20 g syntetisk jord (tørmasse) til hver kontrol- og behandlingsbeholder. Testorganismer tilsættes senest to timer efter klargøringen af det endelige testsubstrat (dvs. efter tilsætning af testkemikaliet). I specifikke tilfælde (f.eks. når aldring betragtes som en afgørende faktor) kan tidsrummet mellem klargøringen af det endelige testsubstrat og tilsætningen af miderne forlænges (flere oplysninger om en sådan aldring findes i (18)). Der skal dog gives en videnskabelig begrundelse.

20. Efter tilsætning af miderne til jorden, fodres miderne, og hver testbeholder vejes, således at der foreligger en startvægt, der kan bruges som grundlag for overvågning af jordens fugtindhold under testen, som beskrevet i punkt 24. Testbeholderne overdækkes derefter som beskrevet i punkt 8 og anbringes i testkammeret.

21. Der klargøres egnede kontroller for hver af de metoder til påføring af testkemikalier, der er beskrevet i punkt 15-18. De relevante beskrevne fremgangsmåder følges ved klargøring af kontrollerne, bortset fra at testkemikaliet ikke tilsættes. Når det er relevant, tilsættes organiske opløsningsmidler, kvartssand eller andre bærestoffer således til kontrollerne i samme koncentrationer/mængder som i behandlingerne. Hvis et opløsningsmiddel eller et andet bærestof bruges til at tilsætte testkemikaliet, klargøres og testes en yderligere kontrol uden bærestoffet eller testkemikaliet også, hvis opløsningsmidlets toksicitet ikke er kendt (se punkt 17).

▼M6

Testbetingelser

22. Testtemperaturen skal være 20 °C ± 2 °C. Temperaturen registreres mindst en gang om dagen og justeres om nødvendigt. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 16 timers lys og otte timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholdernes område. Af hensyn til sammenligneligheden er disse betingelser de samme som i andre økotoksikologiske test (f.eks. (15)).

23. Der sikres gasudveksling ved at belufte testbeholderne mindst to gange om ugen, hvis der bruges skruelåg. Hvis der bruges gazelåg, skal der lægges særlig vægt på bevarelse af jordens fugtindhold (se punkt 8 og 24).

24. Vandindholdet i jordsubstratet i testbeholderne bevares under testen ved at veje og om nødvendigt tilsætte vand til testbeholderne med jævne mellemrum (f.eks. en gang om ugen). Tab erstattes efter behov med deioniseret vand. Fugtindholdet under testen må højst afvige 10 % fra startværdien.

Fodring

25. Ostemider (Tyrophagus putrescentiae (Schrank, 1781)) har vist sig at være en egnet fødekilde. Små collemboler (f.eks. afkom af Folsomia candida *Willem, 1902, eller Onychiurus fimatus* (19), (20), enchytraeider (f.eks. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) eller nematoder (f.eks. *Turbatrix silusiae de Man, 1913)) kan også være egnede (21)*. Det anbefales at kontrollere foderet, inden det bruges i en test. Fodertypen og -mængden bør sikre et tilstrækkeligt antal unger til at opfylde validitetskriterierne (punkt 6). I forbindelse med udvælgelsen af byttedyr bør testkemikaliets virkningsmåde tages i betragtning (f.eks. kan acaricider også være toksiske for fodermiderne, se punkt 26).

26. Der gives foder ad libitum (dvs. hver gang en lille mængde (spidsen af en spatel)). Der kan også bruges en udsugningsanordning med lav sugning som foreslået i collemboltesten eller en fin malerpensel. Fodring i begyndelsen af testen og to til tre gange om ugen vil sædvanligvis være tilstrækkeligt. Hvis testkemikaliet viser sig at være toksisk for byttedyret, bør det overvejes at øge fodringshyppigheden og/eller finde en anden fødekilde.

Udvælgelse af testkoncentration

27. Forhåndskendskab til testkemikaliets toksicitet kan hjælpe til at finde passende testkoncentrationer, f.eks. fra undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval. En indledende test til bestemmelse af dosisinterval gennemføres om nødvendigt med fem koncentrationer af testkemikaliet i intervallet 0,1-1 000 mg/kg tør jord med mindst en replikat for behandlinger og kontrol. Varigheden af testen til bestemmelse af dosisinterval er 14 dage, hvorefter dødeligheden for voksne mider og antallet af unger bestemmes. Koncentrationsintervallet i den endelige test vælges fortrinsvis, så det omfatter koncentrationer, hvor antallet af unger er påvirket, mens hvor de voksne hunners overlevelse ikke er påvirket. Det er dog måske ikke muligt for kemikalier, der har letale og subletale virkninger ved næsten samme koncentrationer. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Ekstrapolering langt under den laveste koncentration, der har indvirkning på testorganismerne, eller over den højeste testede koncentration bør kun foregå i særlige tilfælde, og en fuld begrundelse gives i rapporten.

Forsøgsdesign

Dosis/respons-test

28. Der foreslås tre design baseret på anbefalingerne som følge af en anden ringtest (formeringstest med enchytraeider (22)). Alle disse designs generelle

▼M6

egnethed blev bekræftet af resultatet af valideringen af H. aculeifer.

29. Når koncentrationsintervallet skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:

— For at bestemme EC_x (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) skal der testes tolv koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentration og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere, f.eks. under eller lig med 1,8 i det forventede effektområde og over 1,8 ved højere og lavere koncentrationer.

— For at fastlægge NOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentration plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor på højst 2,0.

— En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC og ECx. Der anvendes otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

Grænsetest

30. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til bestemmelse af dosisinterval (dvs. 1 000 mg/kg jord (tørvægt)), kan den endelige formeringstest udføres som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg jord (tørvægt). En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at NOEC eller EC_{10} for formering er større end grænsekoncentrationen, og samtidig minimere det antal mider, der bruges i testen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrollen.

Testvarighed og -målinger

31. Eventuelle observerede forskelle mellem adfærd og morfologi hos miderne i henholdsvis kontrollen og de behandlede beholdere registreres.

32. På dag 14 udtages de overlevende mider fra jorden ved varme-/lysekstraktion eller ved en anden egnet metode (se tillæg 5). Antallet af unger (dvs. larver, protonymfer og deutonymfer) og voksne tælles særskilt. Voksne mider, der ikke findes på dette tidspunkt, registreres som døde, eftersom det må antages, at sådanne mider er døde og nedbrudt inden vurderingen. Ekstraktionseffektiviteten skal valideres en eller to gange om året i kontroller med et kendt antal voksne og unger. Effektiviteten skal gennemsnitligt overstige 90 % for alle udviklingstrin samlet set (se tillæg 5). Antallet af voksne og unger justeres ikke for effektivitet.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

33. Oplysninger om de statistiske metoder, der kan bruges til at analysere testresultaterne, fremgår af punkt 36-41. Derudover henvises der til OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (31).

34. Testens primære endepunkt er reproduktionen, her antallet af unger frembragt pr. replikattestbeholder (med ti tilførte voksne hunner). I forbindelse med den statistiske analyse er der brug for det aritmetiske gennemsnit (X)

▼M6

og variansen (s2) for at beregne reproduktionen pr. behandling og pr. kontrol. X og s^2 bruges til ANOVA-procedurer som Student t-testen, Dunnetts test og Williams' test samt til beregning af 95 % konfidensintervaller.

Bemærk: Dette primære endepunkt er lig med frugtbarheden målt som antal levende unger frembragt under testen divideret med antallet af hunner i forældregenerationen tilført i begyndelsen af testen.

35. Antallet af overlevende hunner i de ubehandlede kontroller er et væsentligt validitetskriterium og skal dokumenteres. Som i den indledende test til bestemmelse af dosisinterval skal alle andre tegn på skade også anføres i den endelige rapport.

ECx

36. ECx-værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for den parameter, der er beskrevet i punkt 34, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. probabilistisk analyse, logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Karber-metoden eller simpel interpolation). En EC_x-værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden ECx-værdi skal middelværdierne for hver behandling (X), underkastes en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

37. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Passende statistiske metoder anvendes (i overensstemmelse med OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrollen ved hjælp af en ensidet (mindre) hypotesetest ved $p \leq 0,05$. Eksempler er angivet nedenfor.

38. Normalfordelingen af data kan f.eks. testes med Kolmogorov-Smirnovs goodness-of-fit-test, Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test) eller Shapiro-Wilk-testen (tosidet, $p \leq 0,05$). Cochrans test, Levenes test eller Bartletts test (tosidet, $p \leq 0,05$) kan bruges til at teste varianshomogeniteten. Hvis forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, varianshomogenitet) er opfyldt, kan der udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Multiple sammenligninger (f.eks. Dunnetts test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test, hvis der er tale om et monotont dosis/respons-forhold) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application). Ellers bør ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstras trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

39. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.

40. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddelkontrol) kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle,

▼M6

kan alle replikater af kontrol- og opløsningsmiddelkontrolreplikater samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

Testrapport

41. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— *Testkemikalie*

— testkemikaliets identitet, navn, parti, batch og CAS-nummer, renhed

— testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. log K_{ow}, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og gerne oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord)

— *Testorganismer*

— identifikation og leverandør af testorganismer, beskrivelse af dyrkningsbetingelserne

— testorganismers alder

— *Testbetingelser*

— beskrivelse af forsøgsdesign og procedure

— oplysninger om klargøring af testjorden, detaljeret specifikation, hvis der bruges naturlig jord (oprindelse, historie, partikelstørrelsesfordeling, pH, indhold af organisk stof og jordklassifikation, hvis en sådan foreligger)

— jordens maksimale vandholdende evne

— en beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilføre testkemikaliet til jorden

— oplysninger om hjælpekemikalier, der bruges til administration af testkemikaliet

— testbeholdernes størrelse og testjord (tørmasse) pr. beholder

— testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklussernes varighed, temperatur

— en beskrivelse af fodringen, typen og mængden af foder anvendt i testen, fodringsdatoer

— jordens pH- og vandindhold ved påbegyndelse af og under testen (kontrol og hver behandling)

— detaljeret beskrivelse af ekstraktionsmetode og ekstraktionseffektivitet.

— *Testresultater*

— antal unger bestemt i hver testbeholder ved afslutningen af testen

— antal voksne hunner og deres dødelighed (%) i hver testbeholder ved afslutningen af testen

— en beskrivelse af synlige symptomer eller tydelige adfærdsændringer

— resultater opnået med referencetestkemikaliet

— statistikoversigter (ECx og/eller NOEC), herunder 95 % konfidensgrænser og en beskrivelse af beregningsmetoden

▼**M6**

— en afbildning af koncentrationsresponsforholdet

— afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelle usædvanlige hændelser under testen.

LITTERATUR

(1) M. E. Casanueva (1993), Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata), Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) J. M. Tenorio (1982), Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands, Pacific Insects 24, 259-274.

(3) F. M. Bakker, R. Feije, A. J. Grove, G. Hoogendorn, G. Jacobs, E. D. Loose og P. van Stratum (2003), A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil, JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) W. Karg (1993), Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben, 2nd edition, in: F. Dahl (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. G. Teil, Jena Fischer, s. 523 ff.

(5) . A. Ruf (1991), Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes), in: F. Dusbabek og V. Bukva (eds.): Modern Acarology, Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.

(6) A. Ruf (1995), Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae), Proc. 2nd Symp. EURAAC: s. 241-249.

(7) A. Ruf (1996), Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites, Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio, USA: s. 621-628.

(8) P. H. Krogh og J. A. Axelsen (1998), Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*, in: H. Lokke og C. A. M. van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests, John Wiley Sons, Chichester, s. 239-251.

(9) H. Løkke, C. R. Janssen, R. P. Lanno, J. Römbke, S. Rundgren og N. M. Van Straalen (2002), Soil Toxicity Tests — Invertebrates, in: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils, A. Fairbrother, P. W. Glazebrook, N. M. Van Straalen og J. V. Tarazona (eds.), SETAC Press, Pensacola, USA, s. 128 ff.

(10) H.-J. Schlosser og F. Riepert (1991/92), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen, Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) H.-J. Schlosser og F. Riepert (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N. F. 34, 413-433.

(12) L.-H. Heckmann, K. Maraldo og P. H. Krogh (2005), Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae), Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) H. Petersen (1978), Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency, Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Determination of pH, No. 10390, ISO, Genève.

▼**M6**

(15) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(16) EPPO (2003): EPPO-standarder, Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products, Chapter 8. Soil Organisms and Functions, Bull. OEPP/EPPO Bull., 33, 195-209.

(17) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1993), Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465, ISO, Genève.

(18) A. Fairbrother, P. W. Glazebrock, N. M. Van Straalen og J. V. Tarazona (2002), Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils, SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) H. Chi (1981), Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola), Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) H. J. Schlosser og F. Riepert (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina), Zool.Beitr. N. F. 34(3):395-433.

(21) L.-H. Heckmann, A. Ruf, K. M. Nienstedt og P. H. Krogh 2007, Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey, Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Kapitel C.32 i dette bilag — Formeringstest — Enchytraeider.

(23) ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation) (1994), Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida), Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2, ISO, Genève.

(24) T. R. E. Southwood (1991), Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations, (2nd ed.), Chapman & Hall, London, s. 524 ff.

(25) W. Dunger og H. J. Fiedler (1997), Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.), G. Fischer, Jena, s. 539 ff.

(26) I. Lesna og M. W. Sabelis (1999), Diet-dependent female choice for males with »good genes« in a soil predatory mite, Nature 401, 581-583.

(27) A. Ruf (1989), Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina), Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) A. Ruf (1993), Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae), Dissertation, Universität Bremen.

(29) S. Ignatowicz (1974), Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides), Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) D. K. Kevan, McE., og G. D. Sharma (1964), Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae), Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼**M6**

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner finder anvendelse for denne testmetode (i denne test udtrykkes alle virksomme koncentrationer som en masse af testkemikalie pr. tørmasse testjord):

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

NOEC (nuleffektkoncentration, No Observed Effect Concentration) er den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har NOEC ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med kontrollen.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, Lowest Observed Effect Concentration) er den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrollen har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode.

ECx (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC_{50} er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Testkemikalie er et stof eller en blanding, der testes med denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne betragtes som hensigtsmæssig. Den er beskrevet i bilag C til ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Del 2: Determination of effects on reproduction (23)).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor el.lign.). Bunden af røret dækkes med et stykke filterpapir, der påfyldes vand, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) kan derefter beregnes som følger:

$$\text{WHC (i\% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filterpapirmasse

T = tara (rørmasse + filterpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

▼**M6**

Tillæg 3

Bestemmelse af jordens pH

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (16).

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 timer. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sit volumen af enten en 1 M opløsning af kaliumchlorid (KCl) i analysekvalitet eller en 0,01 M opløsning af calciumchlorid ($CaCl_2$) i analysekvalitet. Suspensionen omrystes grundigt i fem minutter og henstår til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende serie bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

▼M6

Tillæg 4

Dyrkning af *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, fodermider og synkronisering af kultur

Dyrkning af Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Kulturer kan opbevares i plastbeholdere eller glas fyldt med en blanding af gips og kulpulver (i forholdet 9:1). Gipsen kan holdes fugtig ved at tilsætte et par dråber destilleret eller deioniseret vand, hvis det er nødvendigt. De optimale dyrkningstemperaturer er på 20 °C ± 2 °C; lys/mørke-forhold er ikke relevante for denne art. Byttedyr kan være Typrophagus putrescentiae- eller Caloglyphus sp.-mider (fodermider skal håndteres forsigtigt, da de kan give allergi hos mennesker), men nematoder, enchytraeider og collemboler er også egnede som byttedyr. Deres kilde skal registreres. Udvikling af bestande kan indledes med en enkelt hun, eftersom hanner udvikler sig i ubefrugtede æg. Generationer overlapper i vid udstrækning. En hun kan leve mindst 100 dage og kan lægge ca. 100 æg i sin levetid. Der lægges flest æg i alderen 10-40 dage (efter at hunnen er blevet voksen), nemlig 2,2 æg pr. hun pr. dag. Udviklingstiden fra æg til voksen hun er ca. 20 dage ved 20 °C. Der bør holdes mere end en kultur på forhånd.

Dyrkning af Typrophagus putrescentiae:

Miderne holdes i en glasbeholder fyldt med fint, pulveriseret bryggerigær, som sættes i en plastspand fyldt med KNO_3-opløsning for at forhindre miderne i at slippe ud. Fodermiderne anbringes oven på dette pulver. Derefter blandes de forsigtigt med pulveret (som skal udskiftes to gange om ugen) med en spatel.

Synkronisering af kulturen:

Dyr, der bruges i testen, skal have nogenlunde samme alder (ca. syv dage efter at de er nået voksenstadiet). Ved en dyrkningstemperatur på 20 °C opnås dette ved at

overføre hunner til en ren dyrkningsbeholder og tilsætte tilstrækkeligt foder

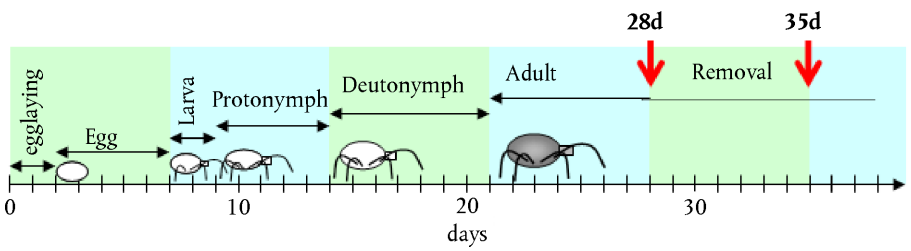
— tillade 2-3 dages æglægning og fjerne hunnerne

— udtage voksne hunner til testen mellem den 28. og den 35. dag efter start og anbringe dem i rene dyrkningsbeholdere.

Voksne hunner kan let skelnes fra hanner og andre udviklingstrin, fordi de er større, har en oppustet form og et brunt dorsalt skjold (hanner er tyndere og flade), umodne dyr er hvide til cremefarvede. Midernes udvikling følger omtrent det mønster, der er beskrevet nedenfor, ved 20 °C (figur): Æg 5 dage, larve 2 dage, protonymfe 5 dage, deutonymfe 7 dage, hunnens præ-æglægningsperiode 2 dage. Herefter er miderne voksne.

Figur

Udvikling af Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer ved 20 °C (fjernelse af hunner, der skal bruges til testen)



▼**M6**

De voksne testdyr fjernes fra den synkroniserede kultur og tilsættes til testbeholderne mellem den 28. og den 35. dag, efter at hunnerne i forældregenerationerne har påbegyndt æglægningen (dvs. 7-14 dage efter at de er blevet voksne). Det sikrer, at testdyrene allerede har passeret præ-æglægningsperioden og har parret sig med hanner, der også er til stede i dyrkningsbeholderen. Observationer i laboratoriekulturer tyder på, at hunner parrer sig umiddelbart eller kort efter at være blevet voksne, hvis der er hanner til stede (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Perioden på syv dage er valgt for at lette integrationen i laboratorierutinen og mindske variabiliteten i midernes udvikling. Æglægningen indledes med mindst det antal hunner, der vil være nødvendig til testen (hvis der f.eks. er brug for 400 hunner i testen, lades mindst 400 hunner lægge ægt i 2-3 dage). Mindst 1 200 æg bør være udgangspunktet for den synkroniserede bestand (kønsforhold ca. 0,5, dødelighed ca. 0,2). For at forhindre kannibalisme er det hensigtsmæssigt ikke at holde mere end 20-30 æglæggende hunner i en beholder.

▼M6

Tillæg 5

Ekstraktionsmetoder

For mikroartropoder er varmeekstraktion en egnet metode til at udtage dyr fra jorden/substratet (se figur nedenfor). Metoden er baseret på organismernes aktivitet, hvilket betyder, at kun mobile dyr vil kunne registreres. Princippet i varmeekstraktion er at gøre betingelserne for organismerne gradvist værre i prøven, således at de vil forlade substratet og falde ned i en fikseringsvæske (f.eks. ethanol). Afgørende punkter er ekstraktionens varighed og gradienten for gode til moderate til dårlige betingelser for organismerne. Varigheden af ekstraktionen med henblik på økotoksikologiske test skal være så kort som muligt, fordi en eventuel populationstilvækst i ekstraktionsperioden ville give falske resultater. På den anden side skal temperatur- og fugtforholdene i prøven altid ligge inden for et interval, der tillader miderne at bevæge sig. Opvarmningen af en jordprøve fører til udtørring af substratet. Hvis udtørringen foregår for hurtigt, vil nogle af miderne måske også tørre ud, inden de kan slippe ud.

Derfor foreslås følgende fremgangsmåde (24) (25):

Apparatur: Tullgren-tragt eller tilsvarende metoder som f.eks. McFadyen (opvarmning ovenfra, prøven anbringes over en tragt)

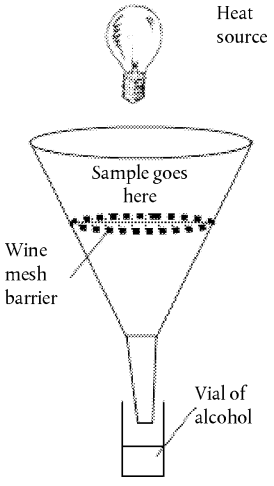
Varmeforhold: 25 °C i 12 timer, 35 °C i 12 timer, 45 °C i 24 timer (i alt 48 timer). Temperaturen måles i substratet.

Fikseringsvæske: 70 % ethanol

Fremgangsmåde: Tag det hætteglas, der blev brugt til testen. Fjern låget, og dæk åbningen med et stykke net eller stof. Stoffet bør have en maskestørrelse på 1,0-1,5 mm. Fastgør stoffet med en elastik. Vend forsigtigt hætteglasset på hovedet, og anbring det i ekstraktionsapparatet. Stoffet forhindrer substrat i at løbe ned i fikseringsvæsken, men tillader mider at forlade prøven. Påbegynd opvarmningen, når alle hætteglas er anbragt. Afslut ekstraktionen efter 48 timer. Fjern hætteglassene med fikseringsvæske, og tæl miderne ved hjælp af et dissektionsmikroskop.

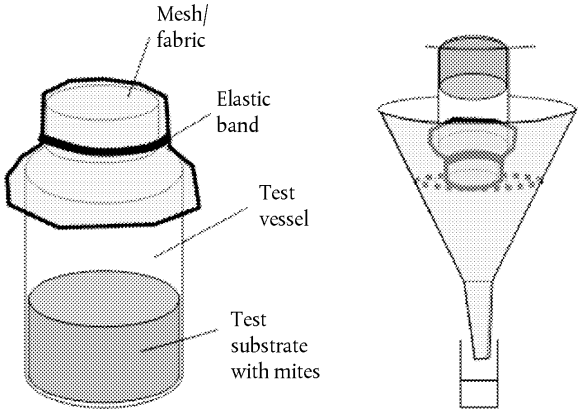
Den valgte metodes ekstraktionseffektivitet skal være påvist mindst en eller to gange om året ved hjælp af beholdere, som indeholder et kendt antal unger og voksne mider i ubehandlet testsubstrat. Effektiviteten skal gennemsnitligt være ≥ 90 % for alle udviklingstrin samlet set.

Tullgren-ekstraktionsanordning



▼**M6**

Klargøring af testhætteglasset efter afslutning af testen og inden ekstraktion



▼**M6**

Tillæg 6

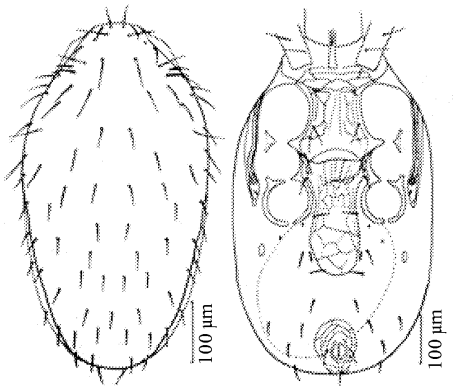
Identifikation af Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Underklasse/orden/underorden:	Familie:	Slægt/underslægt/art:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

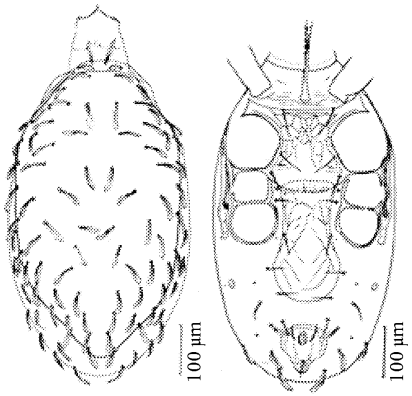
Forfatter og dato:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. januar 2007.

Litteraturliste	W. Karg (1993), Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben, Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. A. M. Hughes (1976), The mites of stored food and houses, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: s. 400 ff. G. W. Krantz (1978), A manual of Acarology, Oregon State University Book Stores, Inc., s. 509 ff.

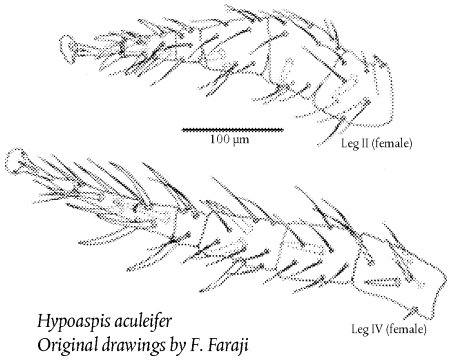
Deterministiske egenskaber:	Tectum med afrundet tandkant; hypostomale riller med mere end seks dentikler; bageste dorsale setae på Z4 ikke særlig lange; børsteformede dorsale setae; genitalt skjold normalt, ikke særlig forstørret og når ikke det anale skjold; bageste halvdel af dorsalt skjold uden uparrede setae; ben II og IV med tykke makrosetae; dorsal seta Z5 ca. to gange længere end J5; fast led på chelicera med 12-14 tænder og bevægeligt led med to tænder; idiosoma 520-685 µm lang. Hypoaspis miles bruges også til biologisk kontrol og kan forveksles med H. aculeifer. Den største forskel er: H. miles tilhører underslægten Cosmolaelaps og har knivlignende dorsale setae, mens H. aculeifer tilhører underslægten Geolaelaps og har børsteformede dorsale setae.



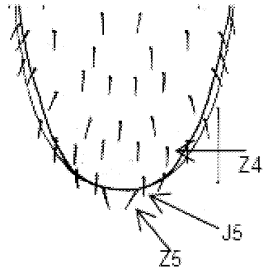
Hypoaspis aculeifer After Hughes, 1976



Hypoaspis miles After Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Original drawings by F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorsal shield with characteristic setae

▼**M6**

Tillæg 7

Grundlæggende oplysninger om biologien for *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer tilhører familien Lealapidae, ordenen Acari (mider), klassen Arachnida, rækken Arthropoda. De lever i alle typer jord og æder andre mider, nematoder, enchytraeider og collemboler (26). Ved fødemangel begynder de at æde hinanden (27). Rovmider består af idiosoma og gnathosoma. For så vidt angår idiosoma, kan der ikke klart skelnes mellem prosoma (forkrop) og opisthosoma (abdomen). Gnathosoma (hovedskjoldet) omfatter instrumenterne til indtagelse af føde, f.eks. palper og chelicera. Chelicererne er tredelte og forsynet med tænder af forskellig størrelse. Ud over indtagelse af føde bruger hannerne primært deres chelicerer til at overføre spermatoforerne til hunnerne. Et dorsalt figur 1skjold dækker idiosoma næsten helt. Kønsorganerne udgør en stor del af idiosoma hos hunner, og de er særlig fremtrædende kort før æglægning. Der er to ventrale skjold, det sternale skjold og det genitale skjold. Alle ben er forsynet med børster og torne. Børsterne bruges til forankring, når dyret bevæger sig i eller på jorden. Det første benpar bruges primært som antenner. Det andet benpar bruger miden ikke kun til at bevæge sig med, men også til at fastholde bytte. Tornene på det fjerde benpar kan benyttes til beskyttelse og som »motor« (28). Hanner er 0,55-0,65 mm lange og vejer 10-15 µg. Hunner er 0,8-0,9 mm lange og vejer 50-60 µg (8)(28) (figur 1).

Figur 1

Hun, han, protonymfe og larve af H. aculeifer.



Ved 23 °C bliver miderne kønsmodne efter henholdsvis 16 dage (hunner) og 18 dage (hanner) (6). Hunnerne overfører sperma med solenostom, hvorfra de overføres til ovariet. I ovariet modnes og opbevares sperma. Befrugtning finder først sted efter modning af sperma i ovariet. De befrugtede eller ubefrugtede æg lægges af hunnerne i klumper eller enkeltvis, fortrinsvis i sprækker eller huller. Parrede hunner kan bære afkom af begge køn, hvorimod der fra æg lagt af uparrede hunner kun klækkes afkom af hankøn. Under udviklingen til voksen gennemgås fire udviklingsstadier (æg — larve, larve — protonymfe, protonymfe — deutonymfe, deutonymfe — voksen).

Ægget er mælkehvidt, glasklart, elliptisk og ca. 0,37 mm langt med en fast skal. Ifølge (8) er larverne 0,42-0,45 mm lange. De har kun tre benpar. I hovedområdet er der udviklet palper og chelicerer. Chelicerne, som har nogle få små dentikler, bruges til klækning fra ægget. Efter den første afstødning af larvehud, 1-2 dage efter klækningen, udvikles protonymferne. De er også hvide, 0,45-0,62 mm lange (8) og har fire benpar. Tænderne er fuldt udviklet på chelicererne. Fra dette stadium begynder miderne at indtage føde. Med henblik herpå gennembores byttets overhud med chelicererne, og et sekret til

▼**M6**

ekstraintestinal fordøjelse sprøjtes ind i byttet. Herefter kan miden suge fødemassen op. Chelicererne kan også bruges til at rive større partikler ud af klumper af føde (28). Efter endnu en afstødning af hud udvikles deutonymferne. De er 0,60-0,80 mm (8) lange og gule til lysebrune. Fra dette stadium kan der skelnes mellem hunner og hanner. Efter en periode med yderligere afstødning af hud, hvor dyrene er inaktive, og det brune skjold udvikler sig (efter ca. 14 dage), er miderne voksne (28)(29)(30). Deres levetid er 48-100 dage ved 25 °C (27).

▼**M6**

Tillæg 8

Sammenfatning og tidsplan for de vigtigste trin i hypoaspistesten

Tid (dage) testens start = dag 0	Aktivitet/opgave
Dag – 35 til – 28	Overfør hunner fra stamkultur til rene beholdere for at påbegynde synkroniseringen 2 dage senere: fjernelse af hunner to eller tre gange om ugen: Giv tilstrækkeligt foder
Dag – 5 (+/– 2)	Klargør syntetisk jord
Dag – 4 (+/– 2)	Bestem den syntetiske jords WHC Tør natten over Næste dag: Vej prøver, og beregn WHC
Dag – 4 (+/– 2)	Fugt syntetisk jord til en WHC på 20-30 %
Dag 0	Start testen: Tilsæt testkemikalie til den syntetiske jord Tilsæt ti hunner til hver replikat Vej hver replikat Opstil abiotiske kontroller for fugtindhold og pH, to replikater for hver behandling Tør fugtkontroller natten over Næste dag: Vej fugtkontroller Næste dag: Mål de tørrede abiotiske kontrollers pH
Dag 3, 6, 9, 12 (ca.)	Tilsæt et tilstrækkeligt antal bytteorganismer til hver replikat Vej hver replikat, og erstat eventuelt fordampet vand
Dag 14	Afslut testen, opstil ekstraktion med alle replikater plus ekstraktionseffektivitetskontroller Tør vandindholdskontroller natten over Næste dag: Vej vandindholdskontroller Næste dag: Mål de tørrede kontrollers pH
Dag 16	Afslut ekstraktion
Dag 16+	Registrer antal voksne og unger i ekstraheret materiale Anfør resultaterne i standardtabeller i rapporten Anfør testproceduren i forsøgsprotokolark.

▼M6

C.37. 21-DAGES ASSAY MED FISK: EN KORTTIDSSCREENINGS-TEST FOR ØSTROGENE OG ANDROGENE VIRKNINGER OG AROMATASEHÆMNING

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 230 (2009). Behovet for at udvikle og validere et assay med fisk, der kan opspore visse hormonforstyrrende kemikalier, udspringer af bekymringer om, at kemikaliekoncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv som følge af disse kemikaliers interaktion med det endokrine system. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og testning af potentielt hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en testvejledning til screening af kemikalier, der påvirker hvirvelløse fiskearters endokrine system. Dette 21-dages assay til screening af det endokrine system hos fisk gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser mellem laboratorier med udvalgte kemikalier med henblik på at påvise assayets relevans og pålidelighed for sporing af østrogen- og aromatasehæmmende kemikalier (1, 2, 3, 4, 5) hos de tre undersøgte fiskearter (tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafisk); sporing af androgene virkninger er mulig hos tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke hos zebrafisk. Denne testmetode giver ikke mulighed for sporing af antiandrogene kemikalier. Valideringsarbejdet har været genstand for en peer review foretaget af et panel af eksperter udnævnt af the National Coordinators of the Test Guideline Programme (6) (de nationale koordinatorer af testvejledningsprogrammet). Assayet er ikke egnet til at identificere specifikke hormonforstyrrende mekanismer, fordi testdyrene har en intakt hypothalamus-hypofyse-gonadeakse (HPG), som kan reagere på kemikaler, der har indvirkning på HPG-aksen på forskellige niveauer. Assayet for fisks reproduktion på kort sigt (Fish Short Term Reproduction assay, OECD TG 229) omfatter frugtbarhed og eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne hos tykhovedet elritse samt alle testmetodens endepunkter. OECD TG 229 vedrører screening for kemikalier, som påvirker reproduktionen via forskellige mekanismer, herunder via det endokrine system. Dette bør overvejes, inden man vælger den mest egnede testmetode.

2. I nærværende testmetode beskrives et in vivo-screeningsassay, hvor kønsmodne hanfisk og gydende hunfisk holdes sammen og eksponeres for et kemikalie i en begrænset del af deres livscyklus (21 dage). Ved afslutningen af eksponeringsperioden på 21 dage måles en eller to — afhængigt af den anvendte art — biomarkørendepunkter hos hanner og hunner som indikatorer på testkemikaliets østrogen- eller aromatasehæmning eller androgene virkninger; disse endepunkter er vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Vitellogenin måles hos tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafish, hvorimod sekundære kønskarakteristika kun måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk.

3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningassay for visse virkninger på det endokrine system, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (28).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Vitellogenin produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som reaktion på cirkulerende endogent østrogen. Det er en præcursor for æggeblommeproteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som udvikles. Vitellogenin er stort set ikke-detekterbart i plasma hos umodne hun- og hanfisk, fordi de ikke har tilstrækkeligt cirkulerende østrogen; leveren kan dog syntetisere og udskille vitellogenin som reaktion på stimulering fra eksogent østrogen.

▼**M6**

5. Målingen af vitellogenin benyttes til at afdække kemikalier med forskellige østrogene virkemåder. Afdækning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af vitellogeninduktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer reviews (f.eks. (7)). Vitellogeninduktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgener (8, 9). En reduktion i niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17β-østradiol, forårsager et fald i vitellogeninniveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (10, 11). Den biologiske relevans af vitellogeninresponsen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og bredt dokumenteret. Det er dog muligt, at produktion af vitellogenin hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-endokrine toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet.

6. Flere målemetoder til rutinebrug er blevet udviklet og standardiseret. Det gælder artsspecifikke enzymkoblede immunadsorptionsteknikker (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)), hvor der bruges immunkemi til kvantificering af vitellogenin produceret i små blod- eller leverprøver indsamlet fra enkeltfisk (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Der udtages prøver af blod fra tykhovedet elritse, blod eller hoved/hale-homogenat fra zebrafisk og lever fra japansk risfisk med henblik på vitellogeninmåling. Hos japansk risfisk er der en god sammenhæng mellem vitellogenin målt fra blod og fra lever (19). Tillæg 6 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til vitellogeninanalyse. Kit til måling af vitellogenin er let tilgængelige; sådanne kit bør være baseret på en valideret artsspecifik ELISA-metode.

7. Sekundære kønskarakteristika for hanner af visse arter er synlige udvendigt, kan kvantificeres og reagerer på cirkulerende niveauer af endogene androgener; det er tilfældet for tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke for zebrafish, som ikke har kvantificerbare sekundære kønskarakteristika. Hunner bevarer evnen til at udvikle sekundære kønskarakteristika for hanner, når de eksponeres for androgene kemikalier i vand. Flere undersøgelser i den videnskabelige litteratur dokumenterer denne type respons hos tykhovedet elritse (20) og japansk risfisk (21). Et fald i sekundære kønskarakteristika hos hanner bør fortolkes med forsigtighed på grund af den lave statistiske styrke og bør være baseret på en ekspertvurdering og vægten af evidens. Der er begrænsninger, for så vidt angår brugen af zebrafisk i dette assay, på grund af fraværet af kvantificerbare sekundære kønskarakteristika, som reagerer på kemikalier med androgene virkninger.

8. Hos tykhovedet elritse er den primære indikator på eksogen androgen eksponering antallet af legevorter på hunfiskens snude. Hos japansk risfisk udgør antallet af papillære strukturer hovedmarkøren for eksogen eksponering for androgene kemikalier hos hunfisk. Tillæg 5A og tillæg 5B indeholder oplysninger om de anbefalede fremgangsmåder til vurdering af kønskarakteristika hos henholdsvis tykhovedet elritse og japansk risfisk.

9. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

10. I assayet eksponeres han- og hunfisk i reproduktiv tilstand sammen i testbeholderne. Deres voksne og reproduktive tilstand gør det muligt klart at skelne mellem kønnene og dermed foretage en kønsrelateret analyse af hvert endepunkt og sikrer, at de er følsomme over for eksogene kemikalier. Ved testens afslutning bekræftes kønnet ved undersøgelse af kønskirtlerne i makroskop efter åbning af abdomen gennem bugen med en saks. Tillæg 2 indeholder en oversigt over de relevante betingelser for bioassayet. Assayet indledes normalt med fisk udtaget fra en bestand i gydningstilstand; der må ikke bruges senescerende dyr. Retningslinjer for fiskens alder og reproduktive tilstand findes i afsnittet om valg af fisk. Assayet udføres med tre eksponeringskoncentrationer af kemikaliet samt en vandkontrol og om

▼M6

nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Der bruges to beholdere eller replikater pr. behandling (hver beholder indeholder fem hanner og fem hunner) ved japansk risfisk og zebrafisk, mens der ved tykhovedet elritse bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling (hver beholder indeholder to hanner og fire hunner). Det sker med henblik på tilpasning til tykhovedet elritse-hannens territoriale adfærd og for samtidig at sikre tilstrækkelig styrke i assayet. Eksponeringen varer 21 dage, og prøveudtagningen af fisk sker på eksponeringens dag 21.

11. Ved prøveudtagningen på dag 21 aflives alle dyr på en human måde. Sekundære kønskarakteristika måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk (se tillæg 5A og tillæg 5B); der tages blodprøver til bestemmelse af vitellogenin hos zebrafisk og tykhovedet elritse; alternativt kan hoved/hale indsamles til bestemmelse af vitellogenin hos zebrafisk (tillæg 6); der indsamles lever med henblik på analyse af vitellogenin hos japansk risfisk (tillæg 6).

ACCEPTKRITERIER FOR TESTEN:

12. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:

— Dødeligheden i vandkontrollerne (eller opløsningsmiddelkontrollerne) må ikke overstige 10 % ved afslutningen af eksponeringsperioden.

— Koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele eksponeringsperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV).

— Vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end ± 1,5 °C mellem testbeholderne og må ikke afvige med mere end 2 °C fra de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 2).

— Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

13. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

a) ilt- og pH-måleudstyr

b) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

c) egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning

d) beholdere fremstillet af et kemisk inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 2)

e) gydningssubstrat for tykhovedet elritse og zebrafisk; de nødvendige oplysninger findes i tillæg 4

f) tilstrækkeligt nøjagtig vægt (dvs. en nøjagtighed på ± 0,5 mg).

▼M6

Vand

14. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på ± 0,5 pH-enheder. For at sikre at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} og $SO4^{2-}$), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant i mindst et år, kan analyserne foretages med større intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 3 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

15. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Saturation columns (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærestof. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, skal der anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne. For kemikalier, der er vanskelige at teste, kan et opløsningsmiddel være den teknisk bedste løsning; det beskrives i OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (22). Valget af opløsningsmiddel afgøres af kemikaliets kemiske egenskaber. OECD's vejledning anbefaler maksimalt 100 µl/l, hvilket skal overholdes. En gennemgang for nylig (23) fremhævede dog yderligere bekymringer i forbindelse med brug af opløsningsmidler til testning af hormonforstyrrelser. Det anbefales derfor, at opløsningsmiddelkoncentrationen om nødvendigt minimeres, når det er teknisk muligt (afhængigt af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber).

16. Der anvendes et testsystem med gennemstrømning. Et sådan system doserer og fortynder kontinuerligt en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en serie af koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. Der skal udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer af lavere kvalitet undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier. Ved valg af materiale til gennemstrømningssystemet bør der tages højde for den eventuelle adsorption af testkemikaliet til dette materiale.

Opbevaring af fiskene

17. Testfisk udvælges fra en laboratoriepopulation, fortrinsvis fra en enkelt bestand, som i mindst to uger forud for testen akklimatiseres under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden (definitioner i tillæg 1) er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 2).

18. Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

▼M6

— dødelighed på mere end 10 % af populationen på syv dage: Hele fiskegruppen kasseres

— dødelighed på mellem 5 % og 10 % af populationen: Akklimatisering i yderligere syv dage, og hvis dødeligheden er over 5 % i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— dødelighed på mindre end 5 % af populationen på syv dage: Fiskegruppen godkendes.

19. Fiskene må ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden, i præeksponeringsperioden eller i eksponeringsperioden.

Præeksponering og valg af fisk

20. Der anbefales en præeksponeringsperiode på en uge, hvor dyrene anbringes i beholdere svarende til dem, der anvendes i den egentlige test. Fisk fodres ad libitum gennem hele opbevaringsperioden og i eksponeringsfasen. Eksponeringsfasen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr (f.eks. med tydelige synlige sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk), som er aktivt gydende. Som generel vejledning (og ikke isoleret ud fra observationen af en given fiskegruppes faktiske reproduktive tilstand) bør tykhovedet elritse være ca. 20 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 °C ± 2 °C i hele deres levetid. Japanske risfisk bør være ca. 16 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 °C ± 2 °C i hele deres levetid. Zebrafisk bør være ca. 16 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 26 °C ± 2 °C i hele deres levetid.

TESTDESIGN

21. Der bruges tre koncentrationer af testkemikaliet, en kontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Dataene kan analyseres for at bestemme statistisk signifikante forskelle mellem behandlings- og kontrolresponser. Disse analyser bruges i højere grad til at vurdere, om der er brug for yderligere længerevarende testning af kemikaliets skadelige virkninger (navnlig overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion), end til risikovurdering (24).

22. Når der bruges zebrafisk og japansk risfisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (fem hanner og fem hunner i hver af de to replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og eventuelt sekundære kønskarakteristika. Når der bruges tykhovedet elritse, udtages der på eksponeringens dag 21 hanner og hunner (to hanner og fire hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære kønskarakteristika.

Udvælgelse af testkoncentration

23. I denne test fastsættes den højeste testkoncentration til den maksimalt tolererede koncentration (MTC) bestemt ud fra test til bestemmelse af dosisinterval eller andre toksicitetsdata eller 10 mg/l eller den maksimale opløselighed i vand, alt efter hvilken der er lavest. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger eksisterende empiriske data om akut toksicitet eller andre toksicitetsdata, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC.

▼M6

24. Der skal benyttes tre testkoncentrationer med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 10, og en fortyndingsvandkontrol (og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol). Det anbefales at benytte en afstandsfaktor på mellem 3,2 og 10.

FREMGANGSMÅDE

Udvælgelse og vejning af testfisk

25. Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved assayets begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i tillæg 2. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for det relevante køn. Det anbefales at veje en delprøve af fiskebestanden inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Eksponeringsbetingelser

Varighed

26. Testens varighed er 21 dage efter en præeksponeringsperiode. Den anbefalede præeksponeringsperiode er en uge.

Fodring

27. Fiskene fodres ad libitum med et passende foder (tillæg 2) og tilstrækkeligt ofte til at bevare kropstilstanden. Mikrobiel vækst og urenheder i vandet skal undgås. Som hovedregel kan den daglige ration opdeles i to eller tre lige store portioner til flere fodringer om dagen med mindst tre timers interval. En større ration kan accepteres, navnlig i weekender. Fiskene bør ikke fodres i 12 timer inden prøveudtagning/makroskopisk undersøgelse.

28. Fiskefoder evalueres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af fytoøstrogener, som ville kompromittere assayets respons på en kendt østrogenagonist (f.eks. østradiol-17β), bør undgås.

29. Foderrester og fækalt materiale skal fjernes fra testbeholderne mindst to gange om ugen f.eks. ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af en sifon.

Lys og temperatur

30. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (se tillæg 2).

Hyppighed af analyser og målinger

31. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikalietilførselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder skal være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikalie regelmæssigt som følger: Gennemstrømningshastigheden for fortyndingsmidlet og giftstofstamopløsningen kontrolleres fortrinsvis dagligt, men som minimum to gange om ugen, og må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Det anbefales, at de faktiske testkemikaliekoncentrationer måles i alle beholdere ved testens begyndelse og efterfølgende ugentligt.

32. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.

33. Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Hvis det er nødvendigt, anbefales centrifugering. Det anbefales at centrifugere prøverne, men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan filtrering også accepteres.

▼M6

34. I løbet af testen skal opløst ilt, temperatur og pH måles i alle testbeholderne mindst en gang om ugen. Samlet hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles i kontrolbeholderne og i en beholder med den højeste koncentration mindst en gang om ugen. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

35. En række generelle (f.eks. overlevelse) og centrale biologiske responser (f.eks. vitellogeninniveauer) vurderes i løbet af assayet eller ved afslutningen af assayet. Måling og evaluering af disse endepunkter og deres anvendelse er beskrevet nedenfor.

Overlevelse

36. Fiskene undersøges dagligt i testperioden, eventuel dødelighed registreres, og den døde fisk fjernes så hurtigt som muligt. Døde fisk erstattes hverken i kontrol- eller testbeholderne. Kønnet for fisk, der dør under testen, bestemmes ved makroskopisk undersøgelse af kønskirtlerne.

Adfærd og udseende

37. Enhver unormal adfærd (i forhold til kontrollerne) registreres; det kan omfatte tegn på generel toksicitet, herunder hyperventilation, ukoordineret svømning, tab af ligevægt og atypisk ubevægelighed eller fouragering. Yderligere ydre abnormaliteter (f.eks. blødning, misfarvning) registreres. Sådanne tegn på toksicitet bør overvejes nøje i forbindelse med fortolkningen af data, da de kan være et tegn på koncentrationer, hvor biomarkører for hormonforstyrrelser ikke er pålidelige. Sådanne adfærdsmæssige observationer kan også være nyttige kvalitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til testning med fisk. Eksempelvis er der observeret territorial aggressivitet hos normale hanner eller maskuliniserede hunner hos tykhovedet elritse under androgen eksponering; hos zebrafisk reduceres eller hindres den karakteristiske parrings- og gydningsadfærd efter daggry ved østrogen eller antiandrogen eksponering.

38. Fordi visse aspekter af udseendet (primært farven) kan ændre sig hurtigt ved håndtering, er det vigtigt, at kvalitative observationer foretages, inden dyrene fjernes fra testsystemet. Tidligere erfaringer med tykhovedet elritse tyder på, at visse hormonforstyrrende kemikalier i første omgang kan forårsage ændringer i følgende ydre karakteristika: kropsfarve (lys eller mørk), farvemønstre (lodrette bånd) og kropsform (hoved- og brystområde). Derfor bør fiskenes fysiske udseende observeres i løbet af testen og ved afslutningen af undersøgelsen.

Human aflivning af fisk

39. På dag 21, dvs. ved eksponeringens afslutning, aflives fiskene med passende mængder tricain (tricainmethansulfonat), metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l bufret med 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne; blod eller væv udtages derefter med henblik på bestemmelse af vitellogenin som forklaret i punktet om vitellogenin.

▼**M6**

Observation af sekundære kønskarakteristika

40. Visse hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage ændringer i specialiserede sekundære kønskarakteristika (antal legevorter hos tykhovedet elritse-hanner, papillære strukturer hos japansk risfisk-hanner). Kemikalier med visse virkemåder kan navnlig forårsage abnormal forekomst af sekundære kønskarakteristika hos dyr af det modsatte køn; eksempelvis kan androgene receptoragonister, som trenbolon, methyltestosteron og dihydrotestosteron, få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle fremtrædende legevorter eller japansk risfisk-hunner til at udvikle papillære strukturer (11, 20, 21). Det er også blevet beskrevet, at østrogenreceptoragonister kan reducere antallet af legevorter og størrelsen af nakkefremspringet hos voksne hanner (25, 26). Sådanne makroskopiske morfologiske observationer kan også være nyttige kvalitative og kvantitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til testning med fisk. Antallet og størrelsen af legevorter hos tykhovedet elritse og papillære strukturer hos japansk risfisk kan kvantificeres direkte eller mere praktisk hos præserverede dyr. Anbefalede fremgangsmåder til evaluering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk findes i henholdsvis tillæg 5A og tillæg 5B.

Vitellogenin (VTG)

41. Blod indsamles fra halearterien/-venen med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør eller alternativt ved hjertepunktur med en kanyle. Afhængigt af fiskens størrelse kan der generelt indsamles 5-60 µl blod pr. individ hos tykhovedet elritse og 5-15 µl pr. individ hos zebrafisk. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering og opbevares med proteaseinhibitorer ved – 80 °C, indtil det skal undersøges for vitellogenin. Alternativt bruges leveren hos japansk risfisk og hoved-/halehomogenat hos zebrafisk som kilde til væv til bestemmelse af vitellogenin (tillæg 6). VTG-målingen skal være baseret på en valideret homolog ELISA-metode, og der skal anvendes en homolog VTG-standard og homologe antistoffer. Det anbefales at bruge en metode, hvor der kan påvises VTG-niveauer så lave som nogle få ng/ml plasma (eller ng/mg væv), som er baggrundsniveauet hos ikke-eksponerede hanfisk.

42. Kvalitetskontrol af vitellogeninanalyse sker ved brug af standarder, blindprøver og mindst to analyser. For hver ELISA-metode gennemføres en test for matrixeffekt (effekt af prøveopløsning) for at bestemme minimumsfaktoren for prøveopløsningen. Hver ELISA-plade, der bruges til VTG-assay, skal omfatte følgende kvalitetskontrolprøver: mindst seks kalibreringsstandarder, som omfatter det forventede interval af vitellogeninkoncentrationer, og mindst en ikke-specifik bindingsassayblindprøve (analyseres to gange). Disse blindprøvers absorbans bør være under 5 % af den maksimale kalibreringsstandardabsorbans. Der analyseres mindst to alikvoter (dobbeltprøver i brønde) af hver prøveopløsning. Dobbeltprøver i brønde, som afviger med mere end 20 %, analyseres igen.

43. Korrelationskoefficienten (R^2) for kalibreringskurverne bør være større end 0,99. En høj korrelation er imidlertid ikke nok til at garantere tilstrækkelig forudsigelse af koncentrationen i alle intervaller. Ud over at have en tilstrækkelig høj korrelation for kalibreringskurven, bør koncentrationen for hver standard, som beregnet på grundlag af kalibreringskurven, være

▼M6

70-120 % af den nominelle koncentration. Hvis de nominelle koncentrationer afviger fra kalibreringsregressionslinjen (f.eks. ved lavere koncentrationer), kan det være nødvendigt at opdele kalibreringskurven i lave og høje intervaller eller bruge en ikke-lineær model til at tilpasse absorbansdataene. Hvis kurven er opdelt, bør R^2 for begge linjesegmenter være > 0,99.

44. Detektionsgrænsen (LOD) defineres som koncentrationen af den laveste analytiske standard, og kvantificeringsgrænsen (LOQ) defineres som den laveste analytiske standard ganget med den laveste fortyndingsfaktor.

45. På hver dag, hvor der gennemføres vitellogeninassay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet (tillæg 7). Forholdet mellem den forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert assaysæt gennemført på den pågældende dag.

DATA OG RAPPORTERING

Evaluering af biomarkørresponser ved variansanalyse (ANOVA)

46. For at identificere et kemikalies potentielle hormonforstyrrende virkning sammenlignes responser for henholdsvis behandlinger og kontrolgrupper ved variansanalyse (ANOVA). Når der bruges en opløsningsmiddelkontrol, udføres en passende statistisk test til sammenligning af fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontroller for hvert endepunkt. Vejledning i hvordan data om fortyndingsvand og opløsningsmiddel håndteres i den efterfølgende statistiske analyse, findes i OECD, 2006c (27). Alle data om biologisk respons analyseres og registreres særskilt i rapporten fordelt på køn. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normalfordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts eller Levenes test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA. Dunnetts test (parametrisk) på flere parvise sammenligninger eller Mann-Whitney-testen med Bonferroni-justering (ikke-parametrisk) kan bruges til ikke-monotont dosis/respons-forhold. Der kan bruges andre statistiske test (f.eks. Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test), hvis dosis/respons-forholdet omtrent er monotont. Tillæg 8 indeholder et statistisk flowdiagram, som kan hjælpe med at træffe beslutning om, hvilken statistisk test der er mest egnet. Der kan desuden findes yderligere oplysninger i OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (27).

Rapportering af testresultater

47. Undersøgelsesdataene skal omfatte:

Testlaboratorium:

— Ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar

— Hvert laboratorium skal have dokumenteret kendskab til en række repræsentative kemikalier.

Testkemikalie:

— Karakterisering af testkemikalie

— Fysisk form og relevante fysisk-kemiske egenskaber

▼**M6**

— Klargøring af testkoncentrationer: metode og frekvens

— Information om stabilitet og bionedbrydelighed.

Opløsningsmiddel:

— Karakterisering af opløsningsmiddel (form, anvendt koncentration)

— Begrundelse for valg af opløsningsmiddel (hvis andet end vand).

Testdyr:

— Art og stamme.

— Leverandør og særlig leverandør

— Fiskens alder ved begyndelsen af testen og reproduktiv tilstand/gydningstilstand

— Oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr

— Fiskenes kropsvægt ved eksponeringsperiodens start (fra en delprøve af fiskebestanden).

Testbetingelser:

— Anvendt testprocedure (testtype, belastningsgrad, bestandtæthed osv.)

— Metode til fremstilling af stamopløsning og gennemstrømningshastighed

— De nominelle testkoncentrationer, ugentligt målte koncentrationer af testopløsningerne og anvendte analysemetoder, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— Fortyndingsvandets karakteristika (herunder pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor, samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof og samtlige andre udførte målinger)

— Vandkvalitet i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— Detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde samt fodermængde og fodringshyppighed såvel som analyser for relevante kontaminanter, hvis de foreligger (f.eks. PCB'er, PAH'er og organochlorpesticider).

Resultater

— Bevis for, at kontrollerne opfylder testens acceptkriterier

— Data om eventuel dødelighed ved enhver testkoncentration og kontrol

— Anvendte statistiske analyseteknikker, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker

— Data om biologiske observationer af makromorfologi, herunder sekundære kønskarakteristika og vitellogenin

▼**M6**

— Resultater af dataanalyserne, fortrinsvis i tabelform og grafisk form

— Forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF TESTRESULTATER

48. Denne del beskriver overvejelser, der bør tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne for de forskellige målte endepunkter. Resultaterne bør fortolkes med forsigtighed, når testkemikaliet tilsyneladende forårsager åbenlys toksicitet eller har indvirkning på testdyrets generelle tilstand.

49. Ved fastsættelse af testkoncentrationsintervallet skal det sikres, at den maksimalt tolerede koncentration ikke overstiges, for at give mulighed for en relevant fortolkning af dataene. Det er vigtigt at have mindst en behandling, hvor der ikke er nogen tegn på toksiske virkninger. Tegn på sygdom og tegn på toksiske virkninger bør vurderes nøje og anføres i rapporten. Det er f.eks. muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-hormonforstyrrende toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet. Fortolkningen af virkningerne kan dog styrkes af andre behandlingsniveauer, som ikke konfunderes af systemisk toksicitet.

50. Nogle få aspekter skal overvejes, hvis testresultaterne skal godkendes. Som hovedregel skal VTG-niveauerne måles hos kontrolgrupper af hanner og hunner hver for sig og være adskilt med omkring tre størrelsesordener hos tykhovedet elritse og zebrafisk og omkring en størrelsesorden hos japansk risfisk. Eksempler på værdiintervallerne i kontrol- og behandlingsgrupperne findes i valideringsrapporterne (1, 2, 3, 4). Høje VTG-værdier hos hanner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise svage østrogenagonister. Lave VTG-værdier hos hunner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise aromataseinhibitorer og østrogenagonister. Valideringsundersøgelserne dannede udgangspunkt for vejledningen.

51. Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør) anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence. Det anbefales at bruge kemikalier med en række virkemåder eller indvirkning på en række testendepunkter. I praksis opfordres hvert laboratorium til at opbygge sine egne historiske kontroldata for hanner og hunner og teste et positivt kontrolkemikalie for østrogenaktivitet (f.eks. østradiol-17β ved 100 ng/l eller en kendt svag agonist), som fører til øget VTG hos hanfisk, et positivt kontrolkemikalie for aromataseinhibering (f.eks. fadrozol eller prochloraz ved 300 µg/l), som fører til reduceret VTG hos hunfisk, og et positivt kontrolkemikalie for androgen aktivitet (f.eks. trenbolon-17β ved 5 µg/l), som fører til induktion af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse- og japansk risfisk-hunner. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne (1, 2, 3), for at sikre at laboratoriet har den fornødne tekniske kompetence.

52. Generelt betragtes VTG-målinger som positive, hvis der er en statistisk signifikant stigning i VTG hos hanner ($p < 0,05$) eller et statistisk signifikant fald hos hunner ($p < 0,05$), som minimum ved den højeste testede dosis, sammenlignet med kontrolgruppen, og hvis der ikke er tegn på generel toksicitet. Et positivt resultat underbygges yderligere af påvisningen af et biologisk sandsynligt forhold mellem dosis- og responskurven. Som nævnt tidligere har faldet i vitellogenin muligvis ikke udelukkende endokrin oprindelse; et positivt resultat bør dog generelt fortolkes som bevis for hormonforstyrrende virkning in vivo og bør normalt give anledning til yderligere afklaring.

▼**M6**

LITTERATUR

(1) OECD (2006a), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD 2007, Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) J. W. Owens (2007), Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay, CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (tilgået 18. september 2008).

(5) US EPA 2007, Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report, ikke-offentliggjort rapport af 15. december 2007, Environmental Protection Agency Washington, DC. s. 104 ff.

(6) OECD (2008), Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter og Jobling (1995), Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) S. Pawlowski, A. Sauer, J. A. Shears, C. R. Tyler og T. Braunbeck (2004), Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay, Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) L. Andersen, R. Goto-Kazato, J. M. Trant, J. P. Nash, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio), Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) G. T. Ankley, M. D. Kahl, K. M. Jensen, M. W. Hornung, J. J. Korte, E. A. Makynen og R. L. Leino (2002), Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas), Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

(11) G. H. Panter, T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, A. Sherren, R. D. Stanley og C. R. Tyler (2004), Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development, Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) L. G. Parks, A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc og C. V. Sullivan (1999), Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) G. H. Panter, C. R. Tyler, S. Maddix, P. M. Campbell, T. H. Hutchinson, R. Länge, C. Lye og J. P. Sumpter (1999), Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals, CEFIC-EMSG research report reference AQ001, CEFIC, Bruxelles, Belgien.

(14) M. Fenske, R. B. van Aerle, S. C. Brack, C. R. Tyler og H. Segner (2001), Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals, Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) H. Holbech, L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen og P. Bjerregaard (2001), Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio), Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131.

(16) J. Rose, H. Holbech, C. Lindholst, U. Noerum, A. Povlsen, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2002), Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio), Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) F. Brion, B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr og J. M. Porcher, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio), Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) H. Yokota, H. Morita, N. Nakano, I. J. Kang, H. Tadokoro, Y. Oshima, T. Honjo og K. Kobayashi (2001), Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes), Jpn J Environ Toxicol 4:87-98.

(19) N. Tatarazako, M. Koshio, H. Hori, M. Morita og T. Iguchi (2004), Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka, Journal of Health Science 50:301-308.

(20) G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl, J. J. Korte, M. W. Homung, T. R. Henry, J. S. Denny, R. L. Leino, V. S. Wilson, M. C. Cardon, P. C. Hartig og L. E. Gray (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow, Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) M. Seki, H. Yokota, H. Matsubara, M. Maeda, H. Tadokoro og K. Kobayashi (2004), Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes), Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Satety Publitations, Series on Testing and Assessment, No. 23, Paris

(23) T. H. Hutchinson, N. Shillabeer, M. J. Winter og D. B. Pickford (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; s. 69-92.

(24) T. H. Hutchinson, G. T. Ankley, H. Segner og C. R. Tyler (2006b), Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as »signposts«, not »traffic lights,« in risk assessment, Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

(25) S. R. Miles-Richardson, V. J. Kramer, S. D. Fitzgerald, J. A. Render, B. Yamini, S. J. Barbee og J. P. Giesy (1999), Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas), Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) D. Martinovic, L. S. Blake, E. J. Durhan, K. J. Greene, M. D. Kahl, K. M. Jensen, E. A. Makynen, D. L. Villeneuve og G. T. Ankley (2008), Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action, Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised), Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, Series on Testing and Assessment No. 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼**M6**

Tillæg 1

Forkortelser og definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

CV: Variationskoefficient.

ELISA: Enzymkoblet immunadsorptionsteknik.

Belastningsgrad: Fiskens vådvægt pr. vandvolumen.

Bestandtæthed: Antal fisk pr. vandvolumen.

VTG (vitellogenin): Phospholipid-glycoprotein-precursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

HPG-akse: Hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

MTC: Maksimalt tolereret koncentration, som udgør ca. 10 % af LC_{50}.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

Testbetingelser for assay til screening af det endokrine system hos fisk

1. Anbefalet art	**Tykhovedet elritse** (Pimephales promelas)	**Japansk risfisk** (Oryzias latipes)	**Zebrafisk** (Danio rerio)
2. Testtype	Gennemstrømning	Gennemstrømning	Gennemstrømning
3. Vandtemperatur	25 °C ± 2 °C	25 °C ± 2 °C	26 °C ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)
5. Lysintensitet	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode (daggry/skumringsovergange er valgfri, men betragtes ikke som nødvendige)	16 t. lys, 8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke
7. Belastningsgrad	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testkammerstørrelse	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volumen testopløsning	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 6 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
11. Testorganismers alder	Se punkt 20.	Se punkt 20.	Se punkt 20.
12. Voksne fisks omtrentlige vådvægt (g)	Hunner: 1,5 ± 20 % Hanner: 2,5 ± 20 %	Hunner: 0,35 ± 20 % Hanner: 0,35 ± 20 %	Hunner: 0,65 ± 20 % Hanner: 0,4 ± 20 %
13. Antal fisk pr. testbeholder	6 (2 hanner og 4 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)
14. Antal behandlinger	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)
15. Antal beholdere pr. behandling	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Antal fisk pr. testkoncentration	16 voksne hunner og 8 hanner (4 hunner og 2 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)
17. Fodring	Levende eller frosne saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående

▼**M6**

18. Beluftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning
19. Fortyndingsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand
20. Præ-eksponeringsperiode	7 dage anbefales	7 dage anbefales	7 dage anbefales
21. Varighed af eksponering for kemikaliet	21 dage	21 dage	21 dage
22. Biologiske endepunkter	overlevelse adfærd sek. kønskarakteristika VTG	overlevelse adfærd sek. kønskarakteristika VTG	overlevelse adfærd VTG
23. Testgodkendelse	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 24 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt > 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 26 °C ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte testkoncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.

▼**M6**

Tillæg 3

Kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

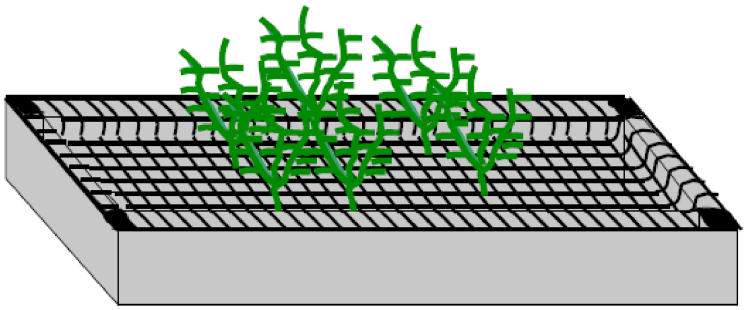
Komponent	KONCENTRA-TIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organiske phosphorpesticider i alt	< 50 µg/l
Chlorerede organiske pesticider i alt + polychlorbiphenyler	< 50 µg/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

▼M6

Tillæg 4A

Gydningssubstrat til zebrafisk

Gydningsbakke: instrumentbakke af glas, f.eks. 22 × 15 × 5,5 cm (l × b × d), dækket med et aftageligt rustfrit metalgitter (maskebredde 2 mm). Gitteret bør dække instrumentbakkens åbning på et niveau under kanten.



Gydningssubstratet fastgøres på gitteret. Det skal fungere som en struktur, fisken kan bevæge sig ind i. Syntetiske akvarieplanter fremstillet af grønt plastmateriale er f.eks. egnede (NB: eventuel adsorption af testkemikaliet til plastmaterialet bør overvejes). Plastmaterialet bør være udvasket i et tilstrækkeligt volumen varmt vand, til at sikre at ingen kemikalier kan afgives til testvandet. Ved brug af glasmaterialer sikres det, at fiskene hverken skades eller sidder fast i forbindelse med deres kraftige aktivitet.

Afstanden mellem bakken og glaspladen bør være mindst 3 cm, for at sikre at gydningen ikke sker uden for bakken. De æg, der lægges på bakken, falder gennem gitteret og kan udtages 45-60 min. efter belysningens start. De gennemsigtige æg er ikke-klæbende og kan let tælles med tværgående lys. Når der bruges fem hunner pr. beholder, kan et antal æg på op til 20 om dagen betragtes som lavt, op til 100 som middel og over 100 som højt. Gydningsbakken fjernes, æggene indsamles, og gydningsbakken anbringes i testbeholderen igen, enten så sent som muligt om aftenen eller meget tidligt om morgenen. Bakken skal anbringes senest efter en time, da gydningssubstratet ellers kan forårsage individuel parring og gydning på et usædvanligt tidspunkt. Hvis situationen kræver, at gydningsbakken anbringes senere, skal det ske mindst ni timer efter belysningens start. På dette sene tidspunkt på dagen induceres gydning ikke længere.

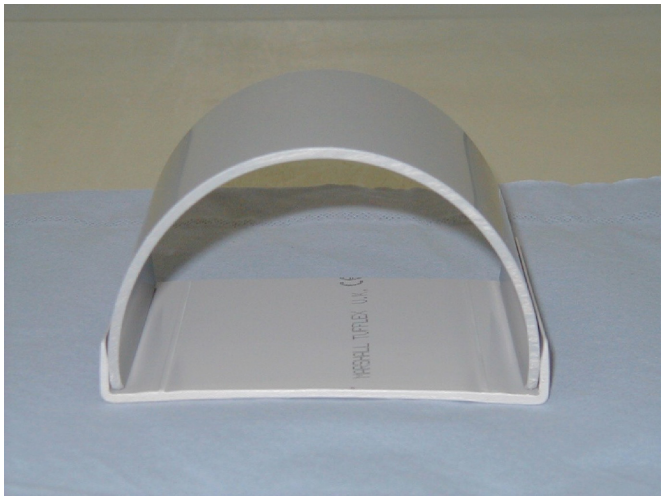
▼**M6**

Tillæg 4B

Gydningssubstrat til tykhovedet elritse

To eller tre kombinerede gydningsfliser og bakker af plast/keramik/glas eller rustfrit stål anbringes i hvert testkammer (f.eks. 80 mm lang grå halvcirkelformet rende på en 130 mm lang bakke med kanter) (se billede). Korrekt tørrede PVC-fliser eller keramikfliser har vist sig at være egnede til at modtage et gydningssubstrat (Thorpe et al., 2007).

Det anbefales, at fliserne slibes for at fremme adhæsion. Bakken bør desuden afskærmes for at hindre fiskenes adgang til de nedfaldne æg, medmindre det har vist sig, at æg klæber til det anvendte gydningssubstrat.



Bunden er udformet, så den indeholder eventuelle æg, der ikke klæber til flisens overflade og derfor falder ned i bunden af beholderen (eller de æg, der lægges direkte på den flade plastbund). Alt gydningsssubstrat bør udvaskes i mindst 12 timer i fortyndingsvand inden brug.

LITTERATUR

K. L. Thorpe, R. Benstead, T. H. Hutchinson og C. R. Tyler (2007), An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas,* Aquatic Toxicology, 81, 90-98.

▼M6

Tillæg 5A

Vurdering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse med henblik på påvisning af visse hormonforstyrrende kemikalier

Oversigt

Potentielt vigtige udseenderelaterede karakteristika hos voksne fisk af arten tykhovedet elritse i test til påvisning af hormonforstyrrende stoffer omfatter kropsfarve (lys/mørk), farvemønstre (tilstedeværelse eller fravær af lodrette bånd), kropsform (hoved- og brystområde, udvidet abdomen) og specifikke sekundære kønskarakteristika (antal og størrelse af legevorter, størrelse af nakkefremspring og æglægningsorgan).

Legevorter befinder sig på hovedet (nakkefremspringet) hos formeringsaktive tykhovedet elritse-hanner og er sædvanligvis arrangeret i et bilateralt symmetrisk mønster (Jensen et al., 2001). Hunner og afkom af hankøn og hunkøn i kontrollerne udvikler ikke vorter (Jensen et al., 2001). Der kan være op til otte individuelle vorter omkring hannernes øjne og mellem næseborene. Det største antal og de største vorter befinder sig i to parallelle linjer umiddelbart under næseborene og omkring munden. Hos mange fisk er der grupper af vorter under underkæben; dem, der er tættest på munden, forekommer som regel som et enkelt par, mens sættet tættere på bugen kan bestå af op til fire vorter. Det faktiske antal vorter er sjældent højere end 30 (interval: 18-28; Jensen et al., 2001). De fremherskende vorter (for så vidt angår antal) er til stede som en enkelt, relativt rund struktur med en højde omtrent svarende til radius. De fleste formeringsaktive hanner har også, i det mindste nogle, vorter, som er så forstørrede og fremtrædende, at de ikke kan skelnes som individuelle strukturer.

Visse typer hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage abnormal forekomst af visse sekundære kønskarakteristika hos det modsatte køn; androgenreceptoragonister, såsom methyltestosteron-17β eller trenbolon-17β, kan f.eks. få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle legevorter (Smith, 1974; Ankley et al., 2001; 2003), mens østrogenreceptoragonister kan mindske antallet eller størrelsen af legevorter hos hanner (Miles-Richardson et al., 1999; Harries et al., 2000).

Nedenfor beskrives karakteriseringen af legevorter hos tykhovedet elritse baseret på fremgangsmåder brugt i U.S. Environmental Protection Agencys laboratorium i Duluth, MN. Specifikke produkter og/eller specifikt udstyr kan erstattes med tilgængelige sammenlignelige alternativer.

Observation opnås bedst med et forstørrelsesglas med lys eller et 3X-dissektionsmikroskop med lys. Observer fisken fra ryggen og med forenden fremad (hoved mod objektiv).

a) Anbring fisken i en lille petriskål (f.eks. 100 mm i diameter) med forenden fremad og bugen nedad. Fokuser med søgeren for at identificere vorterne. Rul forsigtigt og langsomt fisken fra side til side for at identificere områder med vorter. Tæl og vurder vorterne.

b) Gentag observationen for den ventrale overflade af hovedet ved at anbringe fisken på ryggen med forenden fremad i petriskålen.

c) Observationer skal være afsluttet inden for to minutter pr. fisk.

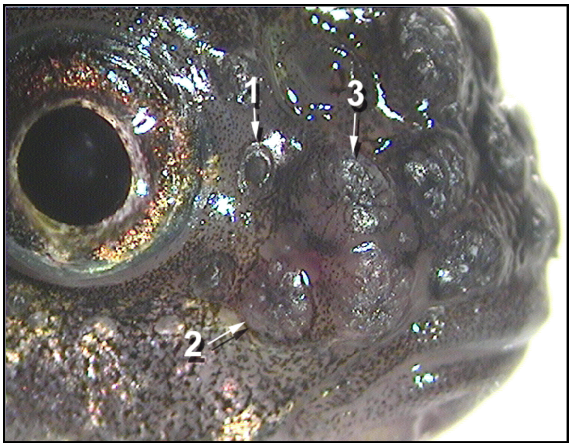
▼M6

Tælling og vurdering af vorter

Der er identificeret seks områder for vurdering af tilstedeværelsen og udviklingen af vorter hos voksen tykhovedet elritse. Der er udviklet en model for kortlægning af placering af og antal vorter (se sidst i dette tillæg). Antallet af vorter registreres, og deres størrelse kan kvantitativt vurderes som følger: 0 — fraværende, 1 — tilstedeværende, 2 — forstørret og 3 — udtalt for hver organisme (figur 1).

Score 0 — fravær af vorter. Score 1 — tilstedeværelse af vorter; identificeres som vorter med et enkelt punkt, hvis højde stort set svarer til dets radius (diameter). Score 2 — forstørret vorte; identificeres som væv, der ligner en asterisk, normalt med en stor radial base med fordybninger ud fra midten. Vorten er ofte mere forrevet, men kan undertiden være en smule afrundet. Score 3 — udtalt vorte; er normalt ret stor og afrundet med mindre defineret struktur. Vorterne løber nogle gange sammen og danner en enkelt masse i et område eller en kombination af områder (B, C og D, beskrevet nedenfor). Farve og mønster ligner score 2, men kan være forholdsvis vilkårligt. Med dette vurderingssystem opnås normalt en samlet score for vorter på < 50 hos en normal han i kontroller med 18-20 vorter (Jensen et al., 2001).

Figur 1



Det faktiske antal vorter kan hos nogle fisk være større end antallet af kasser i modellen (tillæg A) for et givet vurderingsområde. Yderligere vurderingstal kan i givet fald markeres i, til højre for eller til venstre for kassen. Modellen skal således ikke nødvendigvis være symmetrisk. En anden teknik til kortlægning af vorter, som er parret eller hænger sammen lodret langs mundens vandrette plan, er dobbeltmarkering af to vortevurderingspunkter i en enkelt kasse.

Kortlægningsområder:

A — Vorter omkring øjnene. Kortlagt fra ryg mod bug omkring øjnenes forkant. Almindeligvis flere hos modne hanner i kontroller, ikke til stede hos hunner i kontroller, generelt parret (en ved hvert øje) eller enkeltvis hos hunner, der eksponeres for androgener.

B — Vorter mellem næsebor (porer, sensorisk kanal). Normalt i par hos hanner i kontroller ved højere udviklingsniveauer (2 — forstørret eller 3 — udtalt). Ikke til stede hos hunner i kontroller med en vis forekomst og udvikling hos hunner, der eksponeres for androgener.

C — Vorter umiddelbart foran næseborene, parallelt med munden. Generelt forstørrede eller udtalte hos hanner i kontroller. Til stede eller forstørrede hos mindre udviklede hanner eller androgenbehandlede hunner.

▼M6

D — Vorter parallelt langs mundlinjen. Vurderes generelt som udviklede hos hanner i kontroller. Fraværende hos hunner i kontroller, men til stede hos hunner, der eksponeres for androgener.

E — Vorter på underkæben, tæt på munden, normalt små og sædvanligvis i par. Varierende hos hanner i kontroller eller behandlede hanner og hos behandlede hunner.

F — Vorter ventralt i forhold til E, normalt små og i par. Tilstedeværende hos hanner i kontroller og hos hunner, der eksponeres for androgener.

LITTERATUR

(1) G. T. Ankley, K. M. Jensen, M. D. Kahl, J. J. Korte og M. E. Makynen (2001), Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas), Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl, J. J. Korte, M. W. Hornung, T. R. Henry, J. S. Denny, R. L. Leino, V. S. Wilson, M. C. Cardon, P. C. Hartig og E. L. Gray (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow, Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) J. E. Harries, T. Runnalls, E. Hill, C. A. Harris, S. Maddix, J. P. Sumpter og C. R. Tyler (2000), Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas), Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) K. M. Jensen, J. J. Korte, M. D. Kahl, M. S. Pasha og G. T. Ankley (2001), Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas), Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) M. D. Kahl, K. M. Jensen, J. J. Korte og G. T. Ankley (2001), Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow, J Fish Biol 59:515-523.

(6) S. R. Miles-Richardson, V. J. Kramer, S. D. Fitzgerald, J. A. Render, B. Yamini, S. J. Barbee og J. P. Giesy (1999), Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas), Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) R. J. F. Smith (1974), Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas), Can J Zool 52:1031-1038.

Vortemodel **Numerisk score**

ID _____ 1 — tilstedeværende

Dato _____ 2 — forstørret

Score i alt _____ 3 — udtalt

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M6

Tillæg 5B

Vurdering af sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk med henblik på påvisning af visse hormonforstyrrende kemikalier

Nedenfor findes en beskrivelse af målingen af papillære strukturer (*), som er de sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk (Oryzias latipes).

(*) Papillære strukturer ses normalt kun hos voksne hanner og observeres på finnestråler fra den anden til den syvende eller ottende talt fra den bageste ende af gatfinnen (figur 1 og 2). Strukturerne forekommer dog sjældent på den første finnestråle fra den bageste ende af gatfinnen. Denne standardprocedure omfatter måling af strukturer på den første finnestråle (i denne standardprocedure henviser finnestrålenummeret til rækkefølgen fra den bageste ende af gatfinnen).

1) Efter udskæring af leveren (tillæg 6) anbringes kadaveret i et konisk rør, som indeholder ca. 10 ml 10 % neutralt bufret formalin (opad: hoved, nedad: hale). Hvis kønskirtlen er fikseret i andet end 10 % neutralt bufret formalin, foretages et tværsnit på tværs af kadaveret mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel, idet det omhyggeligt undgås at skade kønsåbningen og selve kønskirtlen (figur 3). Anbring kraniesiden af fiskekroppen i fikseringsopløsningen for at præservere kønskirtlen og halesiden af fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin som beskrevet ovenfor.

2) Når fiskekroppen er anbragt i 10 % neutralt bufret formalin, gribes den forreste del af gatfinnen med en pincet og holdes bøjet i omkring 30 sekunder for at holde gatfinnen åben. Når gatfinnen gribes med pincetten, tager man forsigtigt fat i nogle få finnestråler i den forreste del for ikke at ridse de papillære strukturer.

3) Når gatfinnen har været holdt åben i omkring 30 sekunder, opbevares fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin ved stuetemperatur indtil måling af de papillære strukturer (måling bør foretages efter fiksering i mindst 24 timer).

Måling

1) Når fiskekroppen har været fikseret i 10 % neutralt bufret formalin i mindst 24 timer, opsamles fiskekadaveret fra det koniske rør, og formalinet tørres af med filterpapir (eller en papirserviet).

2) Anbring fisken med abdomen opad. Afskær derefter forsigtigt gatfinnen med en lille dissektionssaks (det foretrækkes, at en smule pterygiophor afskæres sammen med gatfinnen).

3) Grib den forreste del af den afskårne gatfinne med en pincet, og anbring den på en glasplade med flere dråber vand. Dæk derefter gatfinnen med et dækglas. Det er vigtigt ikke at ridse de papillære strukturer, når man griber gatfinnen med pincetten.

4) Tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer ved hjælp af tælleren i et biologisk mikroskop (opretstående mikroskop eller omvendt mikroskop). De papillære strukturer genkendes, når en lille formation af strukturer er synlig

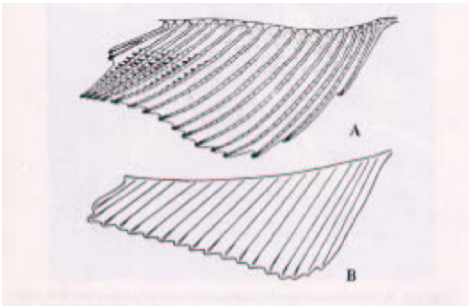
▼M6

på bagkanten af ledskiven. Registrer antallet af ledskiver med papillære strukturer i hver finnestråle på arbejdsarket (f.eks. første finnestråle: 0, anden finnestråle: 10, tredje finnestråle: 12 osv.), og indtast summen i Excel-arket for hver fisk. Tag om nødvendigt et billede af gatfinnen, og tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer på billedet.

5) Efter målingen anbringes gatfinnen i det koniske rør, der er beskrevet i (1), og opbevares.

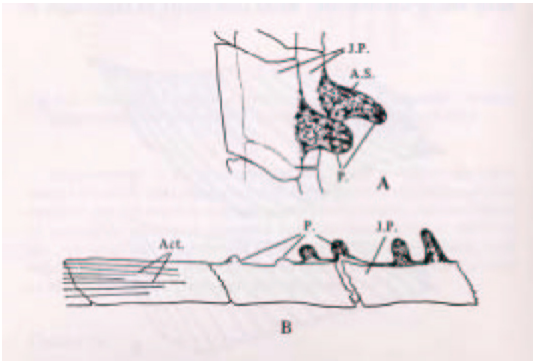
Figur 1.

Diagram, der viser kønsforskelle i gatfinnens form og størrelse. A, han; B, hun. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish, J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Figur 2.

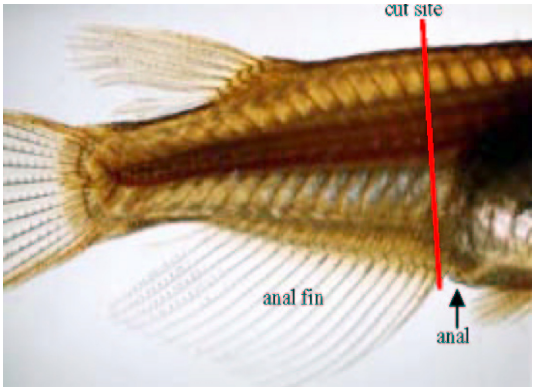
A — Strukturer på gatfinnes ledskiver. J.P. (joint plate): ledskive; A.S. (axial space): aksial afstand; P. (process): struktur. B — Finnestråles distale ekstremitet. Actinotrichia (Act.) er på spidsen. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish, J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

Figur 3.

Billede af fiskekrop, der viser det sted, hvor der skal skæres, når kønskirtlen er fikseret i en anden fikseringsopløsning end 10 % neutralt bufret formalin. I givet fald afskæres den resterende del af kroppen mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel (rød streg). Hovedsiden af fiskens krop anbringes i fikseringsopløsningen til kønskirtlen, og halesiden af fiskekroppen anbringes i 10 % neutralt bufret formalin.



▼M6

Tillæg 6

Anbefalede procedurer for prøveudtagning til vitellogeninanalyse

Det sikres, at der ikke forekommer krydskontamination mellem VTG-prøver fra hanner og hunner.

Fremgangsmåde 1A: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Efter bedøvelse afskæres haleroden delvist med en skalpel, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et heparinieret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Når blodet er indsamlet, isoleres plasma hurtigt ved centrifugering i 3 minutter ved 15 000 *g* (eller alternativt i 10 minutter ved 15 000 g ved 4 °C). Om ønsket kan hæmatokritprocenten bestemmes efter centrifugering. Plasmadelen fjernes derefter fra mikrohæmatokritrøret og opbevares i et centrifugeglas med 0,13 enheder aprotinin (en proteaseinhibitor) ved – 80 °C, indtil vitellogenin kan bestemmes. Afhængigt af størrelsen af den tykhovedede elritse (som er kønsbestemt) kan der generelt indsamles et plasmavolumen på 5-60 mikroliter pr. fisk (Jensen et al., 2001).

Fremgangsmåde 1B: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra hjertet

Alternativt kan blod indsamles ved hjertepunktur med en heparinieret kanyle (1 000 enheder heparin pr. ml). Blodet overføres til Eppendorf-rør (holdt på is) og centrifugeres (5 min., 7 000 g, stuetemperatur). Plasmaet overføres til rene Eppendorf-rør (i alikvoter, hvis plasmavolumenet tillader det) og nedfryses omgående ved – 80 °C, indtil det skal analyseres (Panter et al., 1998).

Fremgangsmåde 2A: Japansk risfisk, udskæring af leveren hos japansk risfisk

Fjernelse af testfisken fra testkammeret

(1) Testfisk fjernes fra testkammeret med et lille fiskenet. Undgå at tabe testfisken ned i andre testkamre.

(2) Testfisk skal principielt fjernes i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol. Derudover bør alle hanner fjernes fra et testkammer, før de resterende hunner fjernes.

(3) Hver testfisks køn identificeres ud fra ydre sekundære kønskarakteristika (f.eks. gatfinnens form).

(4) Anbring testfisken i en transportbeholder, og bær den til arbejdsstationen med henblik på udskæring af leveren. Kontroller, at etiketterne på testkammeret og transportbeholderen er korrekte, og at antallet af fisk, der er blevet fjernet fra testkammeret, og antallet af fisk, som er tilbage i testkammeret, er som forventet.

(5) Hvis kønnet ikke kan identificeres ud fra fiskens ydre udseende, fjernes alle fisk fra testkammeret. I givet fald identificeres kønnet ved observation af kønskirtlen eller sekundære kønskarakteristika under stereoskopisk mikroskop.

▼**M6**

Udskæring af leveren

(1) Overfør testfisken fra transportbeholderen til opløsningen med anæstetikum ved hjælp af det lille fiskenet.

(2) Når testfisken er bedøvet, overføres den til filterpapir (eller en papirserviet) med en almindelig pincet. Når testfisken gribes, bruges pincetten til at tage fat på hver side af hovedet, så halen ikke går i stykker.

(3) Tør vandet af testfiskens overflade med filterpapiret (eller papirservietten).

(4) Anbring fisken med abdomen opad. Foretag derefter et lille tværsnit halvvejs mellem den ventrale nakkeregion og den midterste del af bugen med en dissektionssaks.

(5) Indfør dissektionssaksen i det lille snit, og foretag et snit i abdomen fra et punkt bag gælleklappen til den forreste del af anus langs abdomens midterlinje. Dissektionssaksen må ikke føres for dybt ind, da man risikerer at skade leveren og kønskirtlen.

(6) Foretag følgende operationer under et stereoskopisk mikroskop.

(7) Anbring testfisken med abdomen opad på papirservietten (petriskål af glas eller objektglas er også en mulighed).

(8) Udvid bughulens vægge med en præcisionspincet, og blotlæg de indre organer. Det er også acceptabelt om nødvendigt at blotlægge de indre organer ved at fjerne den ene side af bughulevæggen.

(9) Blotlæg den forbundne del af leveren og galdeblæren med en anden præcisionspincet. Grib galdegangen, og afskær galdeblæren. Sørg for ikke at ødelægge galdeblæren.

(10) Grib spiserøret, og afskær mave-tarm-kanalen fra leveren på samme måde. Sørg for, at indholdet i mave-tarm-kanalen ikke flyder ud. Afskær den bageste del af mave-tarm-kanalen fra anus, og fjern kanalen fra bughulen.

(11) Fjern fedtmassen og andet væv fra leverens periferi. Sørg for ikke at ridse leveren.

(12) Grib området ved den hepatiske portal med en præcisionspincet, og fjern leveren fra bughulen.

(13) Anbring leveren på objektglasset. Eventuelt yderligere fedt og udefrakommende væv (f.eks. laget omkring bugen) fjernes fra leverens overflade.

(14) Mål leverens vægt med et 1,5 ml mikrorør som tara med en elektronisk analysevægt. Registrer værdien på arbejdsarket (aflæsning: 0,1 mg). Bekræft identifikationsinformationen på mikrorørets etiket.

(15) Luk låget på det mikrorør, der indeholder leveren. Opbevar det på et kølestativ (eller isstativ).

(16) Efter udskæringen af en lever rengøres dissektionsinstrumenterne eller erstattes med rene instrumenter.

▼M6

(17) Fjern leverne fra alle fiskene i transportbeholderen som beskrevet ovenfor.

(18) Når leverne er skåret ud af alle fisk i transportbeholderen (dvs. alle hanner eller hunner i et testkammer), anbringes alle leverprøver i et reagensglasstativ med en identifikationsetiket og opbevares i en fryser. Når leverne gives til forbehandling kort efter udskæringen, bæres prøverne til den næste arbejdsstation på et kølestativ (eller isstativ).

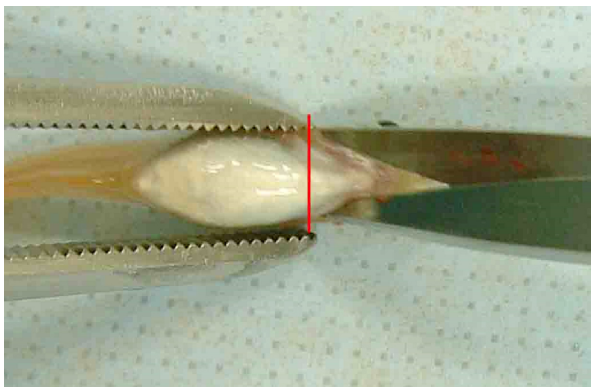
Efter udskæring af leveren kan fiskekadaveret anvendes til måling af sekundære kønskarakteristika.

Prøve

Opbevar leverprøver udtaget fra testfisken ved ≤ – 70 °C, hvis de ikke bruges til forbehandling kort efter udskæringen.

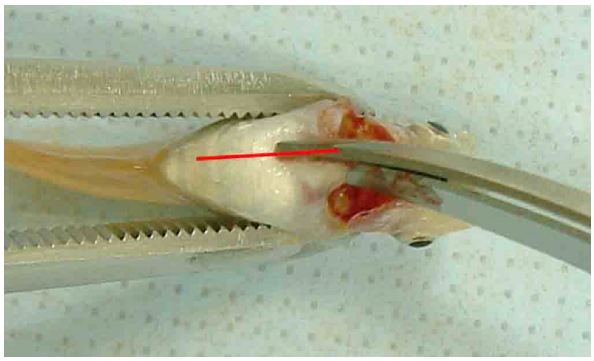
Figur 1

Der foretages et snit lige foran brystfinnerne med en saks.



Figur 2

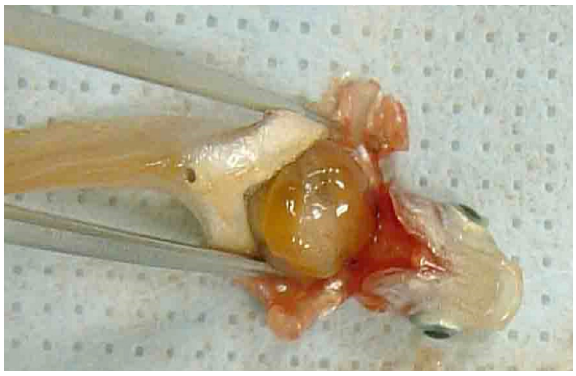
Der foretages et snit langs midterlinjen af abdomen til et punkt ca. 2 mm foran anus.



▼M6

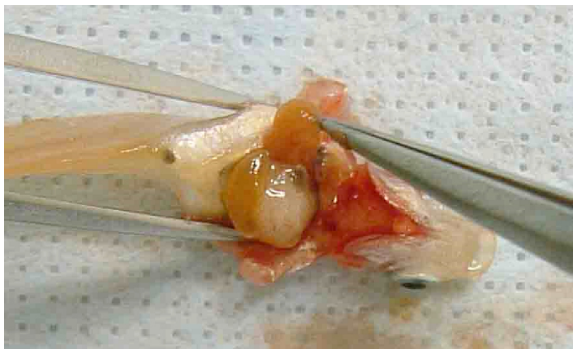
Figur 3

Bugvæggene spredes med pincet for at blotlægge leveren og andre indre organer. (Alternativt hæftes bugvæggene op lateralt).



Figur 4

Leveren dissekeres stumpt og udtages med pincet.



Figur 5

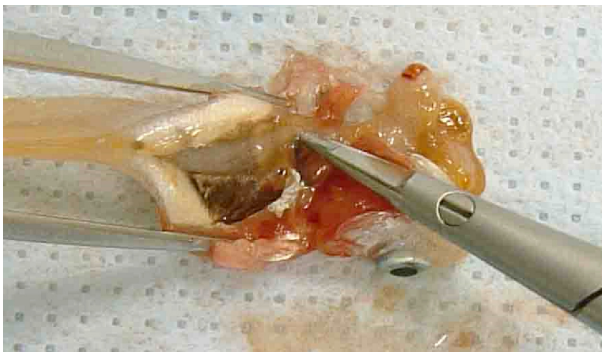
Indvoldene tages forsigtigt ud med pincet.



▼M6

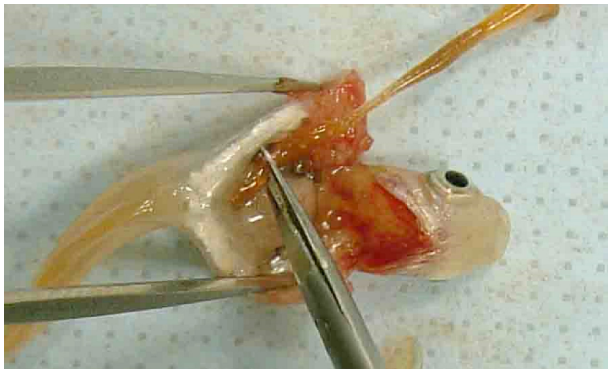
Figur 6

Begge ender af indvoldene og eventuelle tilknyttede mesenteriske strukturer afskæres med saks.



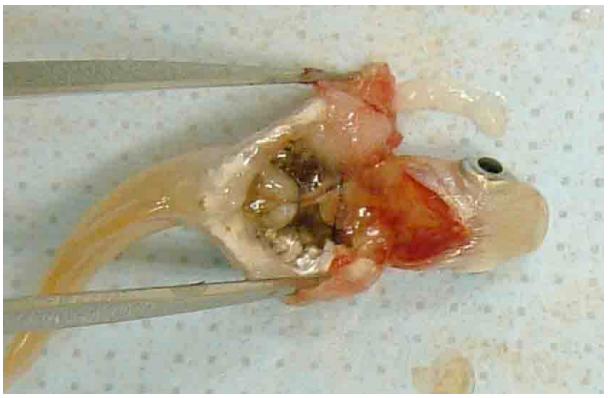
Figur 7 (hun)

Proceduren er identisk for hundyr.



Figur 8

Den afsluttede procedure.



Fremgangsmåde 2B: Japansk risfisk (Oryzias latipes), forbehandling af lever med henblik på vitellogeninanalyse

Tag kolben med homogenatbuffer fra ELISA-kittet, og afkøl den med knust is (opløsningens temperatur: ≤ 4 °C). Hvis der bruges homogenatbuffer fra EnBio ELISA-systemet, optøs opløsningen ved stuetemperatur, og kolben afkøles med knust is.

▼**M6**

Beregn volumenet af homogenatbuffer til leveren på grundlag af dens vægt (tilsæt 50 µl homogenatbuffer pr. mg lever for homogenat). Hvis leveren f.eks. vejer 4,5 mg, skal der bruges 225 µl homogenatbuffer til leveren. Udarbejd en liste over homogenatbuffervolumen for alle levere.

Klargøring af leveren til forbehandling

(1) Tag 1,5 ml-mikrorøret, der indeholder leveren, ud af fryseren umiddelbart inden forbehandlingen.

(2) Forbehandling af leveren fra hanner bør foretages før forbehandlingen af leveren fra hunner for at forhindre vitellogeninkontaminering. Forbehandlingen til testgrupperne bør desuden foregå i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol.

(3) Antallet af 1,5 ml-mikrorør, som indeholder leverprøver taget fra fryseren, må på et givet tidspunkt ikke overstige det antal, der kan centrifugeres på det pågældende tidspunkt.

(4) Arranger 1,5 ml-mikrorørene med leverprøverne i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet (det er ikke nødvendigt at optø leveren).

Udførelse af forbehandlingen

1. Tilsætning af homogeniseringsbufferen

(1) Se på listen, hvilket homogenatbuffervolumen der skal bruges til en specifik leverprøve, og juster mikropipetten (volumeninterval: 100-1 000 µl) til det rette volumen. Sæt en ren spids på mikropipetten.

(2) Tag homogenatbufferen fra reagensglasset, og tilsæt bufferen til 1,5 ml-mikrorøret med leveren.

(3) Tilsæt homogenatbuffer til alle 1,5 ml-mikrorør med lever i henhold til ovennævnte procedure. Det er ikke nødvendigt at sætte en ny spids på mikropipetten. Hvis spidsen er kontamineret eller mistænkes for at være det, skal den dog udskiftes.

2. Homogenisering af leveren

(1) Sæt en ny støder på homogenisatoren med henblik på homogenisering.

(2) Indfør støderen i 1,5 ml-mikrorøret. Hold homogenisatoren, således at leveren presses mellem støderens overflade og mikrorørets indervæg.

(3) Kør homogenisatoren i 10-20 sekunder. Afkøl mikrorøret med knust is under operationen.

(4) Løft støderen op af mikrorøret, og hold den stille i omkring ti sekunder. Undersøg derefter suspensionens tilstand visuelt.

(5) Hvis stykker af lever observeres i suspensionen, gentages trin (3) og (4) for at fremstille et tilfredsstillende leverhomogenat.

▼**M6**

(6) Afkøl det opslæmmede leverhomogenat på isstativet indtil centrifugering.

(7) Udskift støderen for hvert homogenat.

(8) Homogeniser alle levere med homogenatbuffer i henhold til ovennævnte procedure.

3. Centrifugering af det opslæmmede leverhomogenat

(1) Kontroller, at temperaturen i det afkølede centrifugekammer er på ≤ 5 °C.

(2) Indsæt 1,5 ml-mikrorørene med det opslæmmede leverhomogenat i den afkølede centrifuge (juster om nødvendigt balancen).

(3) Centrifuger det opslæmmede leverhomogenat ved 13 000 *g* i 10 min. ved ≤ 5 °C. Hvis supernatanterne er tilstrækkeligt separeret, kan centrifugalkraften og tiden dog justeres efter behov.

(4) Efter centrifugeringen kontrolleres det, at supernatanterne er tilstrækkeligt separeret (overflade: fedtstoffer, mellemlag: supernatant, nederste lag: levervæv). Hvis separationen ikke er tilstrækkelig, centrifugeres suspensionen igen under samme betingelser.

(5) Fjern alle prøver fra den afkølede centrifuge, og arranger dem i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet. Sørg for ikke at resuspendere de enkelte separerede lag efter centrifugeringen.

4. Indsamling af supernatanten

(1) Anbring fire 0,5 ml-mikrorør til opbevaring af supernatanten i reagensglasstativet.

(2) Indsaml 30 µl af hver supernatant (separeret som det mellemliggende lag) med mikropipetten, og fyld det i et 0,5 ml-mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.

(3) Indsaml supernatanten, og fyld den i to andre 0,5 ml-mikrorør på samme måde som beskrevet ovenfor.

(4) Indsaml resten af supernatanten med mikropipetten (om muligt: ≥ 100 µl). Fyld derefter supernatanten i det sidste mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.

(5) Luk mikrorørets låg, og angiv supernatantens volumen på etiketten. Afkøl derefter straks mikrorørene på isstativet.

(6) Sæt en ny spids på mikropipetten for hver supernatant. Hvis en stor mængde fedtstoffer sætter sig fast i spidsen, skal den straks udskiftes, for at forhindre at leverekstraktet kontamineres med fedtstoffet.

(7) Fordel hele den centrifugerede supernatant i fire 0,5 ml-mikrorør i henhold til ovennævnte procedure.

▼M6

(8) Når supernatanten er fordelt i mikrorørene, anbringes de alle i reagensglasstativet med identifikationsetiketten og nedfryses straks. Hvis VTG-koncentrationerne måles umiddelbart efter forbehandlingen, holdes et af mikrorørene (som indeholder 30 µl supernatant) afkølet i reagensglasstativet og overføres til den arbejdsstation, hvor ELISA-assayet udføres. I givet fald anbringes de resterende mikrorør i reagensglasstativerne og fryses i fryseren.

(9) Når supernatanten er indsamlet, kasseres remanensen med det samme.

Opbevaring af prøven

Opbevar mikrorørene med supernatanten fra leverhomogenatet ved ≤ -70 °C, indtil de skal bruges til ELISA-assayet.

Fremgangsmåde 3A: Zebrafisk, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Umiddelbart efter bedøvelse afskæres haleroden på tværs, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et heparinseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Blodvolumenerne er 5-15 µl afhængigt af fiskens størrelse. Et tilsvarende volumen aprotininbuffer (6 µgml i PBS) tilsættes til mikrokapillærrøret, og plasma separeres fra blodet ved centrifugering (fem minutter ved 600 g). Plasma indsamles i testrørene og opbevares ved -20 °C, indtil de skal analyseres for vitellogenin eller andre proteiner af interesse.

Fremgangsmåde 3B: Zebrafisk, indsamling af blod ved hjertepunktur

For at undgå koagulering af blod og nedbrydning af protein indsamles prøverne i phosphatbufret saltvand (PBS), som indeholder heparin (1 000 enheder/ml) og proteaseinhibitoren aprotinin (2 TIU/ml). Det anbefales at bruge ammonium-heparinsalt og lyofiliseret aprotinin som bestanddele i bufferen. Det anbefales at bruge en kanyle (1 ml) med en fast tynd nål (f.eks. Braun Omnikan-F) til blodprøveudtagning. Kanylen bør på forhånd være påfyldt buffer (ca. 100 µl) for helt at eluere de små volumener blod fra hver fisk. Blodprøverne udtages ved hjertepunktur. Først bedøves fisken med MS-222 (100 mg/l). Ved det rette anæstesiniveau kan brugeren identificere zebrafiskens hjerteslag. Under hjertepunktur holdes kanylens stempel under svagt tryk. Der kan indsamles 20-40 mikroliter blod. Efter hjertepunktur fyldes blod/buffer-blandingen i reagensglasset. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering (20 min.; 5 000 g) og opbevares ved – 80 °C, indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde 3C: Standardprocedure: Zebrafisk, homogenisering af hoved og hale

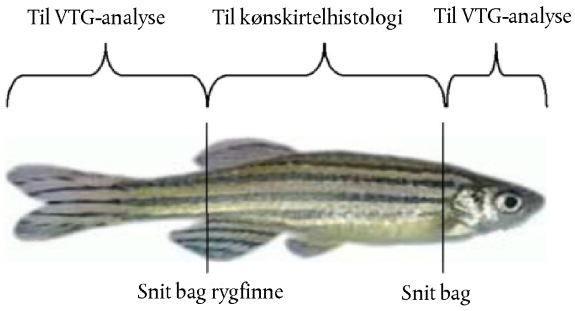
(1) Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.

(2) Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med figur 1.

Bemærk: Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »vitellogeninforurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikke-inducerede hanner.

▼**M6**

Figur 1



(3) Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.

(4) Når delene er vejet, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og nedfryses ved – 80 °C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is og resulterer i en homogen masse). Bemærk: Rørene nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropssektion, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.

(5) Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold homogeniseringsbuffer (*) på 4 gange vævsvægten. Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. Vigtigt: Der bruges nye pistiller til hver fisk.

(6) Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved 4 °C ved 50 000 × g i 30 min.

(7) Anvend en pipette til at fordele portioner a 20 µl supernatant i mindst to rør ved at dyppe spidsen af pipetten ned under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.

(8) Rørene opbevares ved – 80 °C indtil brug.

(*) **Homogeniseringsbuffer:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma)): 12 mM Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaseinhibitorblanding.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), f.eks. fra Bie & Berntsen, Danmark.

— Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv), produktnummer P 8340.

— *Bemærk:* Homogeniseringsbufferen skal anvendes samme dag, som den er fremstillet. Anbringes på is under brug.

▼**M6**

Tillæg 7

Vitellogeninspikede prøver og referencestandard for assayet

På hver dag, hvor der gennemføres vitellogeninassay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet. Det vitellogenin, der bruges til at fremstille referencestandarden for assayet, vil være fra et andet parti end det, der bruges til at fremstille kalibrereringsstandarder for det udførte assay.

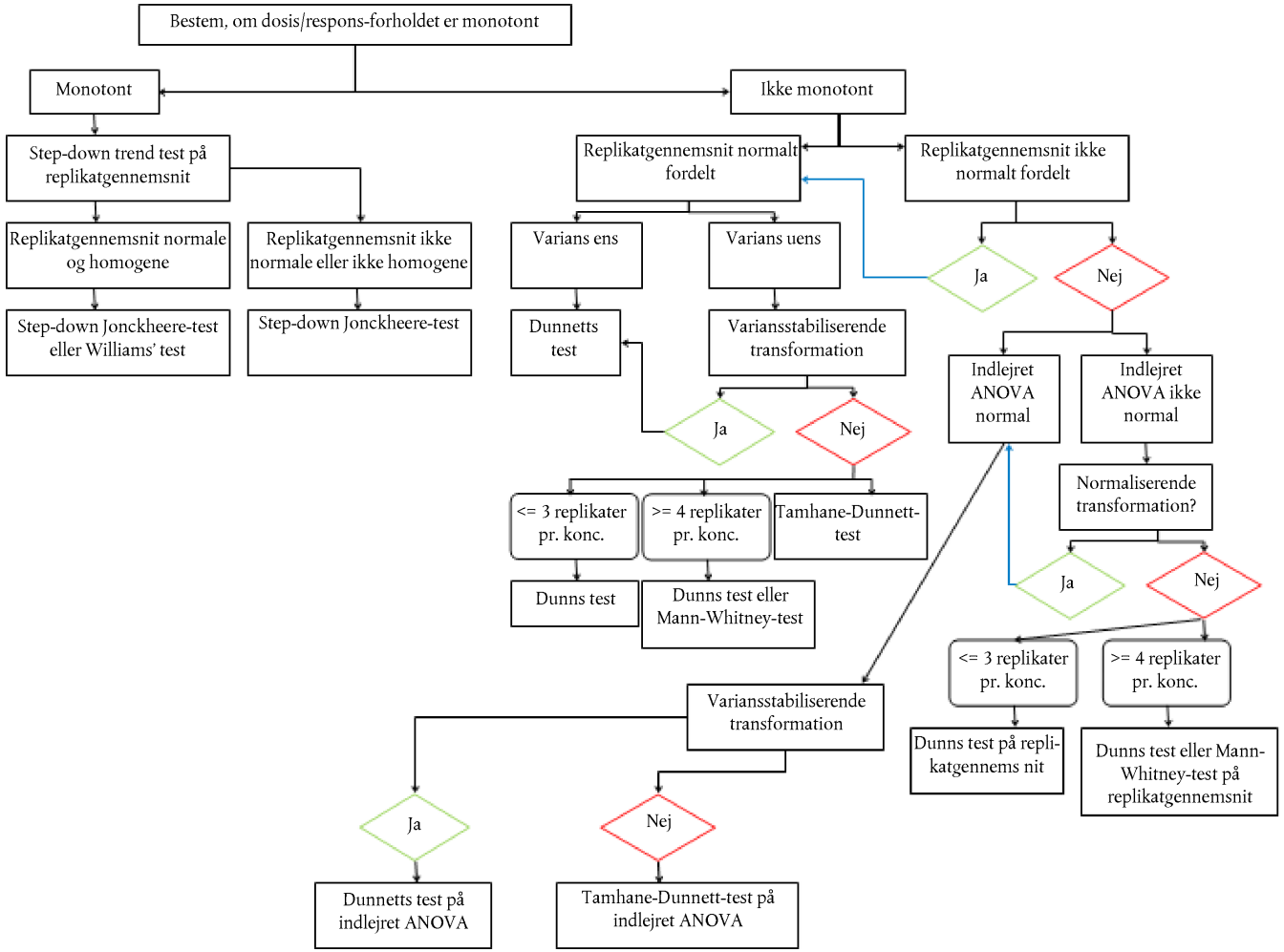
Den spikede prøve fremstilles ved at tilsætte en kendt mængde af standarden for assayet til en prøve af plasma fra hanner i kontrollerne. Prøven spikes til en vitellogeninkoncentration på 10-100 gange den forventede vitellogeninkoncentration for hanner i kontrollerne. Den spikede prøve af plasma fra hanner i kontrollerne kan være fra en enkelt fisk eller en kombination af flere fisk.

En underprøve af ikke-spiket plasma fra hanner i kontrollerne analyseres i mindst to brønde. Den spikede prøve analyseres også i mindst to brønde. Den gennemsnitlige mængde vitellogenin i de to ikke-spikede prøver af plasma fra hanner i kontrollerne lægges til den beregnede mængde vitellogenin, der tilsættes til prøverne for at bestemme en forventet koncentration. Forholdet mellem denne forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert sæt assay gennemført på den pågældende dag.

▼M6

Tillæg 8

Beslutningsflowdiagram til statistisk analyse



02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 231 (2009). Behovet for at udvikle og validere et assay, der kan opspore kemikalier, som er aktive i hvirveldyrarters skjoldbruskkirtelsystem, udspringer af bekymringer for, at kemikaliekoncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet, der havde til formål at revidere de eksisterende TG'er og udvikle nye TG'er for screening og test af potentielle hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en TG for screening af kemikalier, som påvirker hvirvelløse dyrearters skjoldbruskkirtelsystem. Der er stillet forslag om såvel en styrkelse af testen for toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere (kapitel B.7 i dette bilag) som en metamorfoseundersøgelse hos amfibier, Amphibian Metamorphosis Assay (AMA). Den forbedrede metode B.7 gennemgik validering, og der er forelagt en revideret testmetode. Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser inden for og mellem laboratorier, og hvor assayets relevans og pålidelighed blev påvist (1, 2). Efterfølgende foretog et panel af uafhængige eksperter et peer-review af valideringen af assayet (3). Testmetoden er resultatet af erfaringerne fra valideringsundersøgelserne med henblik på påvisning af thyreoideaaktive kemikalier og af arbejde udført andre steder i OECD-medlemslandene.

PRINCIP FOR TESTEN

2. Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) er et screeningassay, som har til formål at foretage en empirisk afdækning af kemikalier, der kan forstyrre hypothalamus-hypofyse-thyreoideaaksens normale funktion (HPT-aksen). AMA er en generel model for hvirveldyr, i det omfang det er baseret på HPT-aksens bevarede strukturer og funktioner. Det er et vigtigt assay, fordi padders metamorfose viser en velundersøgt thyreoideaafhængig proces, der reagerer på kemikalier, som påvirker HPT-aksen, og det er det eneste eksisterende assay, der påviser aktivitet i skjoldbruskkirtlen hos et dyr under morfologisk udvikling.

3. Det generelle forsøgsdesign betyder, at 51 Xenopus laevis-haletudser eksponeres for minimum tre forskellige koncentrationer af et testkemikalie og en fortyndingsvandkontrol i 21 dage. Der foretages fire replikater af hver testbehandling. Larvetætheden ved testens start er 20 haletudser pr. testbeholder for alle behandlingsgrupper. De observationsmæssige endepunkter er baglemslængde, længde fra snude til gat, udviklingstrin, vådvægt, histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen og daglige observationer af dødelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testarter

4. Xenopus laevis dyrkes rutinemæssigt i laboratorier over hele verden og kan let fås fra kommercielle leverandører. Reproduktion kan let induceres hos denne art hele året ved hjælp af injektioner med humant choriongonadotropin (hCG), og de deraf følgende larver kan rutinemæssigt opdrættes i et stort antal til valgte udviklingsstadier, så det er muligt at bruge stadiespecifikke testprotokoller. Larver, der benyttes i assayet, skal helst komme

▼M6

fra internt opdrættede voksne individer. Med henblik på akklimatisering kan æg eller embryoner alternativt sendes til det laboratorium, der udfører testen, selv om dette ikke er den foretrukne fremgangsmåde. Forsendelsen af larver til brug i testen accepteres ikke.

Udstyr og diverse artikler

5. Følgende udstyr og artikler er nødvendige til udførelsen af dette assay:

a) eksponeringssystem (se beskrivelse nedenfor)

b) akvarier af glas eller rustfrit stål (se beskrivelse nedenfor)

c) ynglebeholdere

d) temperaturkontrolapparater (f.eks. varme- eller køleanordninger (justerbar til 22 ° ± 1 °C))

e) termometer

f) binokulært dissektionsmikroskop

g) digitalkamera med en opløsning på mindst 4 megapixel og mikrofunktion

h) billeddigitaliseringssoftware

i) petriskål (f.eks. 100 × 15 mm) eller gennemsigtigt plastkammer af tilsvarende størrelse

j) analysevægt til måling med tre decimaler (mg)

k) apparat til måling af opløst ilt

l) pH-meter

m) lysintensitetsmåler til måling i lux-enheder

n) diverse glasudstyr og værktøjer til laboratoriebrug

o) justerbare pipetter (10-5 000 µl) eller blandede pipetter af tilsvarende størrelser

p) testkemikalie i tilstrækkelige mængder til at foretage undersøgelsen, helst fra en batch

q) analyseinstrumenter, der er egnede til det testede kemikalie, eller kontraktlige analysetjenester.

Kemisk testbarhed

6. AMA er baseret på en vandig eksponeringsprotokol, hvorved testkemikaliet indføres i testkamrene via et gennemstrømningssystem. Gennemstrømningsmetoder medfører imidlertid begrænsninger af, hvilke typer kemikalier der kan testes, hvilket bestemmes af kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. Før denne protokol benyttes, bør der derfor indhentes relevante basisoplysninger om kemikaliet for at afgøre testbarheden, og OECD's Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (4) bør konsulteres. Kendetegn, der viser, at det kan være

▼M6

vanskeligt at teste kemikaliet i vandige systemer, omfatter: høje octanol/vandfordelingskoefficienter (log K_{ow}), høj flygtighed, hydrolysefølsomhed og fotolysefølsomhed under omgivelseslysforhold i laboratoriet. Andre faktorer kan også være relevante for at fastslå testbarheden og bør bestemmes i hvert enkelt tilfælde. Hvis det ikke er muligt at foretage en vellykket test for kemikaliet ved hjælp af et gennemstrømningstestsystem, kan der benyttes et system med statisk udskiftning. Hvis ingen af systemerne egner sig til testkemikaliet, testes der som standard ikke ved hjælp af denne protokol.

Eksponeringssystem

7. Når det er muligt, foretrækkes et gennemstrømningsfortyndersystem frem for et system med statisk udskiftning. Hvis en af testkemikaliernes fysiske og/eller kemiske egenskaber ikke er egnet til et gennemstrømningsfortyndersystem, kan et alternativt eksponeringssystem (f.eks. statisk udskiftning) benyttes. De af systemets komponenter, der har vandkontakt, bør være af glas, rustfrit stål og/eller polytetrafluorethylen. Egnet plast kan dog bruges, hvis det ikke skader undersøgelsen. Eksponeringsbeholderne bør være akvarier af glas eller rustfrit stål udstyret med standrør, som giver et beholdervolumen på ca. 4,0-10,0 l og en vanddybde på minimum 10-15 cm. Systemet bør kunne bære alle eksponeringskoncentrationer og en kontrol med fire replikater pr. behandling. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering (f.eks. 25 ml/min). Behandlingsbeholderne placeres vilkårligt i eksponeringssystemet med henblik på at reducere potentielle virkninger af placeringen, bl.a. mindre variationer i temperatur, lysintensitet osv. Der anvendes fluorescerende lys for at give en lysperiode på 12 timers lys: 12 timers mørke ved en intensitet på 600-2 000 lux (lumen/m^2) ved vandoverfladen. Vandtemperaturen holdes på 22 ° ± 1 °C, pH opretholdes mellem 6,5 og 8,5, og koncentrationen af opløst ilt (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % af luftmætningen) i hver testbeholder. Som minimum måles vandtemperatur, pH og opløst ilt en gang om ugen, temperaturen skal helst måles løbende i mindst en testbeholder. I bilag 1 skitseres de forsøgsbetingelser, hvorunder protokollen udføres. For yderligere oplysninger om fastsættelse af gennemstrømningseksponeringssystemer og/eller systemer med statisk udskiftning henvises til ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (5) og generelle toksikologiske test i vand.

Vandkvalitet

8. Der kan anvendes lokalt tilgængeligt vand (f.eks. kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand), som muliggør normal vækst og udvikling af X. laevis-haletudser. Da den lokale vandkvalitet kan variere betydeligt fra det ene område til det andet, bør vandkvaliteten analyseres, især hvis der ikke foreligger historiske data om, hvorvidt vandet kan bruges til at opdrætte Xenopus. Man skal være særligt opmærksom på, at vandet ikke

▼M6

indeholder kobber, chlorin og chloraminer, som alle er giftige for frøer og haletudser. Det anbefales yderligere at analysere vandet for baggrundsværdier af fluor, perchlorater og chlorat (biprodukter ved desinficering af drikkevand), da alle disse anioner er iodtransportstoffer fra skjoldbruskkirtlen, og høje niveauer af hver af disse anioner kan forstyrre undersøgelsens resultat. Der foretages analyser før påbegyndelse af testen, og testvandet må normalt ikke indeholde disse anioner.

Iodidkoncentration i testvandet

9. For at få skjoldbruskkirtlen til at syntetisere TH skal der være tilstrækkeligt iodid tilgængelig for larverne gennem en kombination af vandige kilder og kostkilder. I øjeblikket er der ingen empirisk afledte retningslinjer for minimale iodidkoncentrationer. Iodidtilgængelighed kan dog påvirke skjoldbruskkirtelsystemets modtagelighed for thyreoideaaktive agenser og er kendt for at modulere skjoldbruskkirtlens basale aktivitet, et aspekt, som fortjener opmærksomhed ved fortolkning af resultaterne fra den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Derfor anføres målte vandige iodidkoncentrationer fra testvandet. På grundlag af de tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne har protokollen vist sig at fungere godt, når iodidkoncentrationerne (I^-) i testvandet lå mellem 0,5 og 10 μg/l. Ideelt bør minimumsiodidkoncentrationen i testvandet ligge på 0,5 μg/l. Hvis testvandet rekonstitueres på grundlag af deioniseret vand, tilsættes iodet ved en minimumskoncentration på 0,5 μg/l. En eventuel tilsætning af iod eller andre salte til testvandet anføres i rapporten.

Opbevaring af dyrene

Pasning af voksne og avl

10. Pasning af voksne og avl udføres i overensstemmelse med standardretningslinjer, og læseren henvises til yderligere oplysninger i standardvejledningen for udførelse af Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX) (6). Disse standardretningslinjer omfatter et eksempel på relevante pasnings- og avlsmetoder, men en streng overholdelse er ikke påkrævet. For at inducere avl injiceres (3-5) par voksne hunner og hanner med humant choriongonadotropin (hCG). Hunner og hanner injiceres med henholdsvis ca. 800 IU-1 000 IU og 600 IU-800 IU hCG opløst i en 0,6-0,9 % saltvandsopløsning. Ynglende par opbevares uforstyrrede og under statiske betingelser i store beholdere for at fremme amplexus. Bunden af hver ynglebeholder bør have en falsk bund af rustfrit stål eller plastvæv, så æggemasserne kan falde ned i beholderens bund. Frøer, som injiceres sidst på eftermiddagen, vil normalt lægge de fleste af deres æg midt på den følgende formiddag. Efter at en tilstrækkelig mængde æg er frigivet og befrugtet, fjernes de voksne dyr fra ynglebeholderne.

Pasning og udvælgelse af larver

11. Efter at de voksne er fjernet fra ynglebeholderne, indsamles æggene og vurderes med henblik på levedygtighed ved hjælp af en repræsentativ delmængde af embryoner fra alle ynglebeholdere. Den eller de bedste gydninger (2-3 anbefales for at vurdere kvaliteten af gydningerne) udtages baseret på embryonernes levedygtighed og tilstedeværelsen af et tilstrækkeligt antal (minimum 1 500) embryoner. Alle organismer, der anvendes i en undersøgelse, bør stamme fra en enkelt gydning (dvs. at gydningerne ikke bør sammenblandes). Embryonerne overføres til en stor flad skål, og alle åbenlyst døde eller abnorme æg (se definition i (5)) fjernes ved hjælp af en pipette eller øjendråbetæller. De sunde embryoner fra hver af de tre gydninger overføres til tre separate udklækningsbeholdere. Fire dage efter at være blevet placeret i udklækningsbeholderne udvælges den bedste gydning baseret på levedygtighed og udklækningssucces, og larverne overføres til et passende antal opdrætsbeholdere ved

▼**M6**

22 ° ± 1 °C. Endvidere flyttes nogle ekstra larver til ekstra beholdere til brug som erstatninger i tilfælde af dødelighed i opdrætsbeholderne i den første uge. Denne fremgangsmåde sikrer en konsistent populationstæthed og mindsker dermed de udviklingsmæssige afvigelser inden for kohorten af en enkelt gydning. Alle opdrætsbeholdere suges rene dagligt. Af forsigtighedshensyn foretrækkes vinyl- eller nitrilhandsker frem for latexhandsker. Hver dag fjernes døde individer, og erstatningslarver udsættes for at opretholde populationstætheden i den første uge. Fodring foretages mindst to gange om dagen.

12. I præeksponeringsfasen akklimatiseres haletudserne til de faktiske eksponeringsbetingelser, bl.a. fodertype, temperatur, lys-/mørkecyklus og dyrkningsmedium. Det anbefales derfor, at det samme dyrknings-/fortyndingsvand bruges i præeksponeringsfasen og i eksponeringsfasen. Hvis haletudserne holdes i et statisk dyrkningssystem i præeksponeringsfasen, udskiftes dyrkningsmediet helt mindst hver anden uge. Sammenklumpning forårsaget af høj larvetæthed i præeksponeringsperioden bør undgås, fordi sådanne virkninger i høj grad kan påvirke haletudsernes udvikling i den efterfølgende testfase. Derfor bør opdrætningstætheden ikke overstige omkring fire haletudser/l dyrkningsmedium (statisk eksponeringssystem) eller 10 haletudser/l dyrkningsmedium (med en gennemstrømningshastighed på f.eks. 50 ml/min. i præeksponeringseller dyrkningssystemet). Under disse betingelser bør haletudserne udvikle sig fra stadium 45/46 til stadium 51 på 12 dage. Repræsentative haletudser fra denne stampopulation kontrolleres dagligt med henblik på udviklingsstadium for at anslå et rette tidspunkt for indledning af eksponeringen. Det bør sikres, at stress og traumer for haletudserne minimeres, især under flytning, rensning af akvarier og håndtering af larver. Belastende betingelser/aktiviteter bør undgås, såsom høj og/eller uophørlig støj, bankning på akvariet, vibrationer i akvariet, for høj aktivitet i laboratoriet og hurtige ændringer i miljømedier (lystilgængelighed, temperatur, pH, DO, vandgennemstrømningshastighed osv.). Udvikler haletudserne sig ikke til stadium 51 inden for 17 dage efter befrugtning, må for høj stress betragtes som en potentiel årsag.

Larvedyrkning og -fodring

13. Haletudser fodres med f.eks. det kommercielle haletudsefoder, som anvendes i valideringsundersøgelserne (se også bilag 1), i hele præeksponeringsperioden (efter Nieuwkoop og Faber (NF) stadium 45/46 (8)) og i hele testperioden på 21 dage eller anden diæt, som har vist sig at give samme resultat af Amphibian Metamorphosis Assay. Fodringen i præeksponeringsperioden justeres omhyggeligt, så den opfylder kravene til haletudsernes udvikling, dvs. at der gives de nyudklækkede haletudser små portioner foder flere gange om dagen (mindst to). Overskydende foder bør undgås for at *i)* bevare vandkvaliteten og *ii)* undgå tilstopning af gællefiltre med fødepartikler og affald. De daglige rationer af det haletudsefoder, der bruges i valideringsundersøgelserne, øges i takt med haletudsens

▼M6

vækst til ca. 30 mg/dyr/dag kort før indledningen af testen. Dette kommercielt tilgængelige foder har i valideringsundersøgelserne vist sig at understøtte X. laevis-haletudsernes korrekte vækst og udvikling og er et finpartikulært produkt, som bliver hængende i vandsøjlen i lang tid og udvaskes med strømmen. Derfor bør den samlede daglige fodermængde opdeles i mindre portioner og gives mindst to gange dagligt. Fodringshyppigheden for dette foder er anført i tabel 1. Fodermængden registreres. Foderet kan gives tørt eller som en stamopløsning fremstillet i fortyndingsvand. En sådan stamopløsning fremstilles frisk hver anden dag og opbevares ved 4 °C, når den ikke er i brug.

Tabel 1

Fodring med kommercielt haletudsefoder anvendt i valideringsundersøgelserne for X. laevis-haletudser i in vivo-delen af AMA under gennemstrømningsbetingelser.

Undersøgelsesdag	Foderration (mg foder/dyr/dag)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analytisk kemi

14. Før gennemførelsen af en undersøgelse vurderes stabiliteten af testkemikaliet på grundlag af eksisterende information om dets opløselighed, nedbrydelighed og flygtighed. Testopløsninger fra hver replikatbeholder for hver enkelt koncentration udtages til kemiske analyser ved testens påbegyndelse (dag 0) og ugentligt under testen for mindst fire prøver. Det anbefales også, at hver testkoncentration analyseres under klargøring af systemet, før testen påbegyndes, for at kontrollere systemets effektivitet. Endvidere anbefales det, at stamopløsningerne analyseres, når de skiftes, især hvis mængden af stamopløsning ikke giver tilstrækkelige kemikaliemængder, der kan udstrækkes til rutineprøvetagningsperiodernes varighed. I tilfælde af kemikalier, som ikke kan påvises ved nogle eller alle de i testen anvendte koncentrationer, bør stamopløsninger måles og systemgennemstrømningshastigheder registreres med henblik på at beregne nominelle koncentrationer.

Kemikalietilførsel

15. Den anvendte metode til at indføre testkemikaliet i systemet kan variere alt efter dets fysisk-kemiske egenskaber. Vandopløselige kemikalier kan opløses i aliquoter af testvandet ved en koncentration, der giver mulighed for tilførsel ved måltestkoncentrationen i et gennemstrømningssystem. Kemikalier, der er flydende ved stuetemperatur og tungtopløselige i vand, kan indføres ved hjælp af væske: væskemætningsmetoder. Kemikalier, der er faste ved stuetemperatur og tungtopløselige i vand, kan indføres ved hjælp af mætningskolonner med glasuld (7). Der skal helst benyttes et testsystem uden bærestof. Forskellige testkemikalier vil dog have forskellige fysisk-kemiske egenskaber, der sandsynligvis vil kræve forskellige tilgange til fremstilling af vand til kemikalieeksponering. Der skal helst gøres en indsats for at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: i) visse opløsningsmidler selv kan føre til toksicitet og/eller uønskede eller

▼M6

uventede endokrinologiske reaktioner, ii) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker gennem brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, og iii) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm i forbindelse med mikrobiel aktivitet. For kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (4), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af kemikaliets kemiske egenskaber. Opløsningsmidler, som er konstateret effektive til toksicitetstest i vandmiljø, omfatter acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol. Såfremt der benyttes et opløsningsmiddel som bærestof, skal opløsningsmidlets koncentrationer ligge under den kroniske nuleffektkoncentration (NOEC). OECD anbefaler højst 100 µl/l i sit Guidance Document, mens det i en senere oversigt anbefales, at der bruges opløsningsmiddelkoncentrationer helt ned til 20 µl/l fortyndingsvand (12). Bruges der opløsningsmidler som bærestoffer, bør passende opløsningsmiddelkontroller evalueres ud over ikkeopløsningsmiddelkontroller (rent vand). Hvis det ikke er muligt at administrere et kemikalie via vandet enten på grund af fysisk-kemiske egenskaber (lav opløselighed) eller begrænset kemisk tilgængelighed, kan det overvejes at indføre det gennem ernæringen. Der er udført forberedende arbejde vedrørende eksponering gennem føden, men denne eksponeringsvej benyttes almindeligvis ikke. Valget af metode dokumenteres og kontrolleres gennem analyse.

Udvælgelse af testkoncentrationer

Fastsættelse af den høje teststofkoncentration

16. Med henblik på denne test fastsættes den høje teststofkoncentration ved testkemikaliets opløselighedsgrænse, den maksimalt tolererede koncentration (MTC) for akut toksiske kemikalier eller 100 mg/l, alt efter hvilken der er lavest.

17. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en akut dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger empiriske data om akut dødelighed, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC. Selv om brugen af regressionsmodeller kan være den teknisk set mest forsvarlige metode til at anslå MTC, kan en nyttig tilnærmelse til MTC afledes af eksisterende akutte data ved at anvende 1/3 af den akutte LC_{50}-værdi. Der kan dog mangle data om akut toksicitet for de arter, der testes. Såfremt der ikke foreligger data om artsspecifik akut toksicitet, kan der foretages en 96-timers LC_{50}-test med haletudser, som er repræsentative (dvs. samme stadie) for dem, der testes i AMA. Hvis data fra andre akvatiske arter er tilgængelige (f.eks. LC_{50}-undersøgelser af fisk eller paddearter), kan der ved et fagligt skøn anslås en sandsynlig MTC på grundlag af ekstrapolering mellem arter.

18. Er kemikaliet ikke akut toksisk og opløseligt over 100 mg/l, bør 100 mg/l alternativt betragtes som den højeste testkoncentration (HTC), da denne koncentration normalt betragtes som »praktisk talt ikketoksisk«.

▼M6

19. Selv om det ikke er den anbefalede fremgangsmåde, kan statiske udskiftningsmetoder benyttes, hvis gennemstrømningsmetoder er utilstrækkelige til at nå frem til MTC. Benyttes der metoder med statisk udskiftning, skal stabiliteten af testkemikaliets koncentration dokumenteres og ligge inden for resultatkravenes grænser. Der anbefales udskiftningsperioder på 24 timer. Udskiftningsperioder på over 72 timer accepteres ikke. Desuden bør vandkvalitetsparametre (f.eks. DO, temperatur, pH osv.) måles ved afslutningen af hver udskiftningsperiode, umiddelbart før udskiftning.

Testkoncentrationsområde

20. Der kræves som minimum tre testkoncentrationer og en kontrolgruppe med rent vand (og om nødvendigt en bærestofkontrolgruppe). Testkoncentrationens minimumsdifference mellem den højeste og den laveste bør være omkring en størrelsesorden. Den maksimale dosisadskillelse er 0,1, og den minimale er 0,33.

FREMGANGSMÅDE

Indledning og gennemførelse af test

Dag 0

21. Eksponeringen indledes, når et tilstrækkeligt antal haletudser i præeksponeringsbestanden har nået udviklingsstadium 51 ifølge Nieuwkoop og Faber (8) og er 17 dage gamle eller derunder efter befrugtning. Ved udvælgelse af forsøgsdyr pooles sunde og normalt udseende haletudser i stampopulationen i en enkelt beholder, der indeholder en passende mængde fortyndingsvand. Til bestemmelse af udviklingsstadium fjernes haletudser enkeltvis fra poolingbeholderen ved hjælp af et lille net eller en sigte og overføres til et gennemsigtigt målekammer (f.eks. en 100 mm Petriskål) med fortyndingsvand. Ved bestemmelse af stadium skal der helst ikke bruges bedøvelsesmidler, men haletudserne kan bedøves enkeltvis før håndtering med 100 mg/l tricain methansulfonat (f.eks. MS-222) med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat (pH 7,0). Hvis der bruges bedøvelse, bør metoden til korrekt brug af f.eks. MS-222 tilvejebringes fra erfarne laboratorier og anføres sammen med testresultaterne. Dyrene håndteres forsigtigt under denne overførsel for at minimere håndteringsstress og undgå skader.

22. Dyrenes udviklingsstadium bestemmes ved hjælp af et binokulært dissektionsmikroskop. For at reducere den endelige variabilitet i udviklingsstadium er det vigtigt, at denne stadieinddeling foretages så nøjagtigt som muligt. Ifølge Nieuwkoop og Faber (8) er baglemsmorfologi det primære udviklingsmæssige kendetegn ved udvælgelse af stadium 51-organismer. Baglemmernes morfologiske karakteristika undersøges under mikroskop. Selv om Nieuwkoop og Fabers (8) fuldstændige vejledning bør konsulteres for at få omfattende information om stadieinddeling af haletudser, kan man pålideligt bestemme stadier gennem fremtrædende morfologiske kendetegn. Følgende tabel kan bruges til at forenkle og standardisere stadieinddelingsprocessen under hele undersøgelsen ved at identificere de fremtrædende morfologiske kendetegn i forbindelse med de forskellige stadier, under antagelse af at udviklingen er normal.

▼M6

Tabel 2

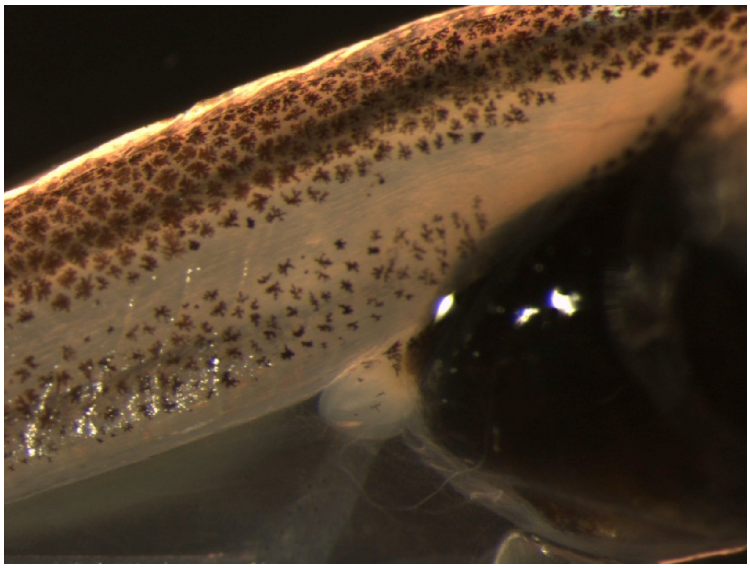
Fremtrædende morfologiske kendetegn til stadieinddeling i henhold til Neuwkoop og Fabers vejledning

Fremtrædende morfologiske kendetegn	Udviklingsstadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Baglem	X	X	X	X	X	X	X									
Forlem						X	X	X	X	X						
Kraniofacial struktur										X	X	X	X			
Lugtenervemorfologi											X	X	X			
Halelængde													X	X	X	X

23. Alle haletudser skal være på stadium 51 for at indlede testen. Det mest fremtrædende morfologiske kendetegn i forbindelse med stadieinddeling er for det stadium baglemsmorfologien, som vises i figur 1.

Figur 1.

Baglemsmorfologi i stadium 51 hos en X. laevis-haletudse.



24. Ud over udvælgelse efter stadium kan der anvendes en valgfri udvælgelse af forsøgsdyr efter størrelse. Til det formål måles hele kropslængden (ikke snude til gat) på dag 0 for en delprøve på ca. 20 haletudser på stadium 51 efter Nieuwkoop og Faber. Efter beregning af gennemsnittet af den fulde kropslængde for denne gruppe dyr kan der fastsættes minimums- og maksimumsgrænser for hele forsøgsdyrenes kropslængde, således at gennemsnitsværdien kan svinge ± 3 mm (gennemsnitsværdier af hele kropslængden svinger 24,0-28,1 mm for stadium 51-haletudser). Inddelingen i udviklingsstadier er dog den primære parameter for at bestemme, om hvert forsøgsdyr er klar. Haletudser med meget synlige misdannelser eller skader udelukkes fra assayet.

▼M6

25. Haletudser, som opfylder de ovenfor beskrevne stadiekriterier, opbevares i en beholder med rent dyrkningsvand, indtil stadieinddelingen er afsluttet. Når stadieinddelingen er afsluttet, fordeles larverne vilkårligt i eksponeringsbehandlingsbeholdere, indtil hver beholder indeholder 20 larver. Hver behandlingsbeholder inspiceres for dyr med et abnormt udseende (f.eks. skader, abnorm svømmeadfærd osv.). Åbenlyst usundt udseende haletudser fjernes fra behandlingsbeholderne og erstattes af nyudvalgte larver fra poolingbeholderen.

Observationer

26. For mere tilbundsgående information om testafslutningsprocedurer og behandling af haletudser henvises til OECD's Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Dag 7-målinger

27. På dag 7 fjernes fem tilfældigt valgte haletudser pr. replikat fra hver forsøgsbeholder. Den tilfældige udvælgelse bør give hver testet organisme lige stor sandsynlighed for at blive valgt. Dette kan opnås ved at benytte en randomiseringsmetode, men kræver, at alle haletudser fanges og tages op. Haletudser, der ikke udvælges, returneres til oprindelsesbeholderen, og udvalgte haletudser aflives humant i 150-200 mg/l f.eks. MS-222 med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat for at komme op på en pH-værdi på 7,0. De aflivede haletudser skylles i vand og duppes tørre, hvorefter kropsvægten bestemmes til nærmeste milligram. Baglemslængde, snude-til-gat-længde og udviklingsstadium (ved hjælp af binokulært dissektionsmikroskop) bestemmes for hver haletudse.

Dag 21-målinger (testafslutning)

28. Ved testens afslutning (dag 21) fjernes de resterende haletudser fra forsøgsbeholderne og aflives humant i 150-200 mg/l f.eks. MS-222 med en passende buffer af natriumhydrogencarbonat, jf. ovenfor. Haletudserne skylles i vand og duppes tørre, hvorefter kropsvægten bestemmes til nærmeste milligram. Udviklingsstadie, SVL og baglemslængder måles for hver haletudse.

29. Alle larver anbringes i Davidson's fiksativ i 48-72 timer enten som helkropsprøver eller som trimmede hovedvævsprøver med underkæbe til histologiske bedømmelser. Til histopatologi udtages i alt fem haletudser fra hver replikatbeholder. Da follikelcellehøjde afhænger af stadium (10), er den mest egnede stikprøvemetode til histologiske analyser at anvende individer i tilsvarende stadie, når det er muligt. For at udvælge individer i samme stadium inddeles alle larver først i stadier før udvælgelsen og efterfølgende behandling til dataindsamling og opbevaring. Dette er nødvendigt, fordi en normal divergens i udvikling vil resultere i forskellige fordelinger på stadier i hver enkelt replikatbeholder.

30. Dyr, som udvælges til histopatologisk undersøgelse (n = 5 fra hvert replikat), matches i forhold til kontrollernes medianstadium (poolede replikater), når det er muligt. Hvis der er replikatbeholdere med over fem larver på det rette stadie, udvælges fem larver tilfældigt.

▼M6

31. Hvis der er replikatbeholdere med under fem larver på det rette stadie, udtages tilfældigt udvalgte individer fra det næste lavere eller højere udviklingsstadium for at nå op på den samlede prøvestørrelse på fem larver pr. replikat. Beslutningen om at udtage ekstra larver fra det næste enten lavere eller højere udviklingsstadium træffes på grundlag af en samlet vurdering af stadiefordelingen i kontrol- og kemikaliebehandlingerne. Dvs. hvis den kemiske behandling er forbundet med en udviklingshæmning, udtages der ekstra larver fra det næste lavere stadium. Hvis den kemiske behandling er forbundet med en fremskyndelse af udviklingen, udtages der ekstra larver fra det næste højere stadium.

32. I tilfælde af alvorlige forandringer i haletudsernes udvikling på grund af behandling med et testkemikalie er der muligvis ingen overlapning i stadiefordeling i de kemiske behandlinger med udviklingsstadiet i den beregnede kontrolmedian. Kun i disse tilfælde bør udvælgelsesprocessen ændres ved at anvende et andet stadium end kontrolmedianstadiet til at nå en udtagning af larver på matchende stadier til histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Er stadierne endvidere ubestemte (dvs. asynkronicitet), vælges fem haletudser fra hvert replikat tilfældigt ud til histologisk analyse. Begrundelsen for at udtage en larve, som ikke er på et stadium svarende til kontrolmedianens udviklingsstadie, anføres.

Bestemmelse af biologiske endepunkter

33. I den 21 dage lange eksponeringsfase foretages måling af primære endepunkter på dag 7 og dag 21, men daglig observation af forsøgsdyrene er dog nødvendig. Tabel 3 giver et overblik over målingens endepunkter og de tilsvarende observationstidspunkter. Mere detaljerede oplysninger om tekniske procedurer for måling af slutpunkter og histologiske vurderinger er tilgængelige i OECD's vejledningsdokumenter (9).

Tabel 3

Observationstidspunkter for primære endepunkter i AMA

Slutpunkter	Dagligt	Dag 7	Dag 21
— Dødelighed	•		
— Udviklingsstadium		•	•
— Baglemslængde		•	•
— Snude-gat-længde		•	•
— Kropsvægt (våd)		•	•
— Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtel			•

▼M6

Slutpunkter

34. Udviklingsstadie, baglemslængde, SVL og vådvægt er slutpunkter for AMA, og hver enkelt diskuteres kort i det følgende. Yderligere teknisk information om indsamling af disse data er tilgængelig i de vejledningsdokumenter, der er henvist til, bl.a. procedurer for computerstøttet analyse, som det anbefales at bruge.

Udviklingsstadium

35. X. laevis-haletudsers udviklingsstadium bestemmes ved hjælp af Nieuwkoop og Fabers stadieinddelingskriterier (8). Data om udviklingsstadier bruges til at bestemme, om udviklingen er fremskyndet, asynkron, forsinket eller upåvirket. Fremskyndelse eller forsinkelse af udviklingen bestemmes ved at foretage en sammenligning mellem det medianstadie, som nås af kontrolgrupperne og de behandlede grupper. Asynkron udvikling anføres, når de undersøgte væv ikke er misdannede eller abnorme, men det relative tidspunkt for morfogenesen eller udviklingen af forskellige væv forstyrres hos en enkelt haletudse.

Baglemslængde

36. Differentiering og vækst af baglemmer kontrolleres af skjoldbruskkirtelhormoner og er vigtige udviklingsmæssige kendetegn, som allerede benyttes i bestemmelsen af udviklingsstadium. Udviklingen af baglemmer bruges kvalitativt i bestemmelsen af udviklingsstadie, men betragtes her som et kvantitativt endepunkt. Derfor måles baglemslængde som et endepunkt for at afdække virkninger på thyreoideaaksen (figur 2). Af konsekvenshensyn måles baglemslængden på det venstre baglem. Baglemslængden evalueres både på forsøgets dag 7 og dag 21. På dag 7 er måling af baglemslængden ligetil, som det fremgår af figur 2. Det er dog mere kompliceret at måle baglemslængden på dag 21, da lemmerne krummer. Derfor måles baglemslængden på dag 21 fra kropsvæggen og ved at følge lemmets midterlinje gennem alle vinkelafvigelser. Ændringer i baglemslængden på dag 7 anses stadig for væsentlige for potentiel aktivitet i skjoldbruskkirtlen, selv om de ikke er synlige på dag 21. Længdemålinger foretages på digitale fotografier ved hjælp software til billedanalyse som beskrevet i OECD's Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Kropslængde og vådvægt

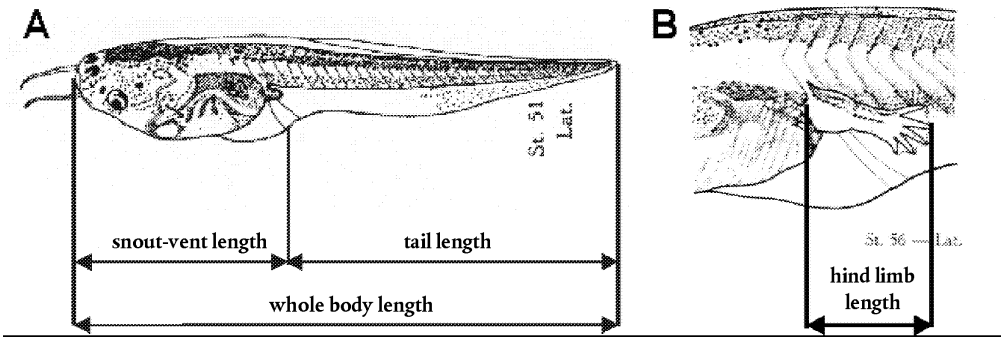
37. Bestemmelser af snude-til-gat-længde (SVL) (figur 2) og vådvægt er inkluderet i testprotokollen for at vurdere testkemikaliernes mulige virkninger på haletudsers vækstrate sammenlignet med kontrolgruppen og er nyttige ved påvisning af generel toksicitet i testkemikaliet. Da fjernelse af vedhængende vand ved vægtbestemmelsen kan skabe stressende forhold for haletudserne og kan forårsage hudskader, udføres disse målinger på dag 7 for haletudserne i delprøven og for alle de resterende haletudser ved testens afslutning (dag 21). Af konsekvenshensyn anvendes den øvre side af gattet som målingens halegrænse.

38. Snude-til-gat-længden (SVL) bruges til at vurdere haletudsens vækst som illustreret i figur 2.

▼M6

Figur 2

(A) Typer af kropslængdemålinger og (B) Målinger af baglemslængder for X. laevis-haletudser (1).



Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtel

39. Selv om udviklingsstadium og baglemslængde er vigtige endepunkter til at evaluere eksponeringsrelaterede ændringer i metamorfisk udvikling, kan udviklingsforsinkelse ikke i sig selv betragtes som en diagnostisk indikator for aktivitet, der skader skjoldbruskkirtlen. Nogle ændringer kan kun observeres ved rutinemæssig histopatologisk analyse. Diagnostiske kriterier omfatter forstørret/formindsket skjoldbruskkirtel, follikelcellehypertrofi, follikelcellehyperplasi og som supplerende kvalitative kriterier: follikulært lumenområde, kolloid kvalitet og follikelcellehøjde/-form. Klassificering i alvorsgrader (4 grader) anføres. Oplysninger om, hvordan prøver udtages og behandles til histologisk analyse, og om udførelse af histologiske analyser af vævsprøver er tilgængelige i »Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation« og »Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas« (9). Laboratorier, der udfører assayet for første gang, bør søge råd hos erfarne patologer med henblik på uddannelse, før de foretager en histologisk analyse og vurdering af skjoldbruskkirtlen. Åbenlyse og væsentlige ændringer i slutpunkter, der viser fremskyndet eller asynkron udvikling, kan betyde, at det ikke er nødvendigt at foretage en histopatologisk analyse af skjoldbruskkirtlerne. Manglende åbenlyse morfologiske ændringer eller bevis for udviklingsforsinkelse skal underkastes histologiske analyser.

Dødelighed

40. Alle testbeholdere kontrolleres dagligt for døde haletudser, og antallene registreres for hver beholder. Dato, koncentration og beholdernummer for eventuel observation af dødelighed registreres. Døde dyr fjernes fra testbeholderen, så snart de observeres. En dødelighed på over 10 % kan tyde på uhensigtsmæssige testbetingelser eller toksiske virkninger af testkemikaliet.

Yderligere observationer

41. Tilfælde af abnorm adfærd og meget synlige misdannelser og læsioner registreres. Dato, koncentration og beholdernummer for eventuelle observationer af abnorm adfærd, grove misdannelser eller læsioner registreres. Normal adfærd er kendetegnet ved, at haletudserne hænger i vandsøjlen med halen hævet over hovedet, slår regelmæssigt og rytmisk med halefinnen, jævnligt kommer op til overfladen for at ånde og reagerer på stimuli. Abnorm adfærd omfatter f.eks. at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli. Endvidere skal store forskelle i fødeindtagelse mellem behandlingerne registreres. Grove misdannelser og

▼M6

læsioner kan omfatte morfologiske abnormiteter (f.eks. deformiteter på lemmer), hæmoragiske læsioner, bakterie- eller svampeinfektioner for blot at nævne nogle få. Disse bestemmelser er kvalitative og anses for at svare til kliniske tegn på sygdom/stress og foretages ved sammenligning med kontroldyr. Hvis forekomsten eller omfanget er større i eksponerede beholdere end i kontrollerne, betragtes disse som bevis for åbenlys toksicitet.

DATA OG RAPPORTERING

Dataindsamling

42. Alle data indsamles ved hjælp af elektroniske eller manuelle systemer, der er i overensstemmelse med god laboratoriepraksis (GLP). Undersøgelsesdataene skal omfatte:

Testkemikalie:

— karakterisering af testkemikaliet: fysisk-kemiske egenskaber, information om stabilitet og bionedbrydelighed

— kemiske oplysninger og data: blanding af fortyndinger: metode og frekvens. Oplysninger om testkemikaliet omfatter faktiske og nominelle koncentrationer af testkemikaliet og i nogle tilfælde eventuelt det ikkeoprindelige kemikalie. Målinger af testkemikaliet kan være påkrævet for både stamopløsninger og testopløsninger

— opløsningsmiddel (hvis det er andet end vand): begrundelse for valg af opløsningsmiddel og beskrivelse af opløsningsmidlet (art, anvendt koncentration).

Testbetingelser:

— Operationelle registreringer: disse består af observationer vedrørende testsystemets funktionsmåde og støttemiljø samt infrastruktur. Typiske registreringer omfatter: omgivende temperatur, testtemperatur, lysperiode, status for kritiske komponenter i eksponeringssystemet (f.eks. pumper, cyklustællere, tryk), gennemstrømningshastigheder, vandstand, standflaskeændringer og foderregistrering. Generelle vandkvalitetsparametre omfatter: pH, DO, ledningsevne, total iod, alkalinitet og hårdhed

— afvigelser fra forsøgsmetoden: denne information bør omfatte alle oplysninger eller forklarende beskrivelser af afvigelser fra forsøgsmetoden.

Resultater:

— biologiske observationer og data: disse omfatter daglige observationer af dødelighed, fødeindtagelse, abnorm svømmeadfærd, sløvhed, tab af balance, misdannelser, læsioner osv. Observationer og data indsamlet med forud fastsatte intervaller omfatter: udviklingsstadie, baglemslængde, snude-til-gat-længde og vådvægt

▼M6

— anvendte statistiske analyseteknikker og begrundelse for de anvendte teknikker, resultater af den statistiske analyse, helst i tabelform

— histologiske data: disse omfatter forklarende beskrivelser samt gradueret sværhedsgrad og specifikke observationers hyppighed, jf. nærmere oplysninger i vejledningsdokumentet vedrørende histopatologisk undersøgelse

— ad hoc-observationer: disse observationer bør omfatte forklarende beskrivelser af undersøgelsen, som ikke passer ind i de hidtil beskrevne kategorier.

Indberetning af data

43. Tillæg 2 indeholder regneark med daglig dataindsamling, der kan bruges som vejledning for indtastning af rådata og for beregninger af statistikoversigter. Endvidere stilles der indberetningsskemaer til rådighed, som passer til indsendelse af resuméer af endepunktsdata. Indberetningsskemaer til histologiske vurderinger kan ses i tillæg 2.

Resultatkrav og testens brugbarhed/validitet

44. Generelt vil grove afvigelser fra testmetoden resultere i uacceptable data til fortolkning eller indberetning. Derfor er følgende kriterier i tabel 4 blevet udarbejdet som vejledning i at bestemme kvaliteten af den udførte test, kontrolorganernes generelle præstation.

Tabel 4

Resultatkrav for AMA

Kriterium	Acceptable grænser
Testkoncentrationer	Opretholdt med en variationskoefficient på ≤ 20 % (variabilitet i målt testkoncentration) over den 21 dage lange test
Dødelighed blandt kontroldyrene	≤ 10 % — dødelighed i et hvilket som helst replikat i kontrollerne må ikke overstige 2 haletudser
Minimumsmedian for udviklingsstadium i kontrollerne ved afslutning af testen	57
Spredning i udviklingsstadium i kontrollen	Den 10. og 90. percentil af udviklingsstadiefordelingen må ikke adskille sig med mere end fire stadier
Opløst ilt	≥ 40 % luftmætning (*)
pH	pH bør fastholdes på 6,5-8,5. Forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige 0,5.
Vandtemperatur	22 ° ± 1 °C — forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige 0,5 °C
Testkoncentrationer uden åbenlys toksicitet	≥ 2
Resultat af replikatet	≤ 2 replikater på tværs af forsøget kan være kompromitteret

▼M6

Kriterium	Acceptable grænser
Særlige betingelser for brug af opløsningsmiddel	Hvis der bruges et opløsningsmiddel som bærestof, benyttes der både en kontrolgruppe med opløsningsmiddel og en kontrolgruppe med rent vand, og resultaterne registreres
	Statistisk signifikante forskelle mellem kontrolgrupperne med opløsningsmiddel og med vand behandles specielt. Se nærmere oplysninger nedenfor
Særlige betingelser for system med statisk udskiftning	Repræsentative kemiske analyser før og efter udskiftning registreres
	Ammoniakniveauer måles umiddelbart inden udskiftning
	Alle vandkvalitetsparametre anført i tabel 1 i tillæg 1 måles umiddelbart inden udskiftning
	Udskiftningsperioden må ikke overstige 72 timer
	Passende ernæringsplan (50 % af den daglige foderration af kommercielt haletudsefoder)

(*) Beluftning af vand kan ske ved gennemboblingsflasker. Det anbefales at indstille gennemboblingsflaskerne på niveauer, der ikke skaber unødig stress for haletudserne.

Testningens gyldighed

45. Følgende krav skal opfyldes, hvis en test skal anses for acceptabel/gyldig:

Gyldigt forsøg i en test, der bestemmes negativ med hensyn til aktivitet i skjoldbruskkirtlen:

(1) For en given behandling (inklusive kontrolgrupper) må dødeligheden ikke overstige 10 %. For et bestemt replikat må dødeligheden ikke overstige tre haletudser, ellers anses replikatet for at være kompromitteret.

(2) Mindst to behandlingsniveauer med alle fire ukompromitterede replikater bør være tilgængelige for analyse.

(3) Mindst to behandlingsniveauer uden åbenlys toksicitet bør være tilgængelige for analyse.

Gyldigt forsøg i en test, der bestemmes positiv med hensyn til aktivitet i skjoldbruskkirtlen:

(1) Dødelighed hos højst to haletudser/replikat i kontrolgruppen kan forekomme.

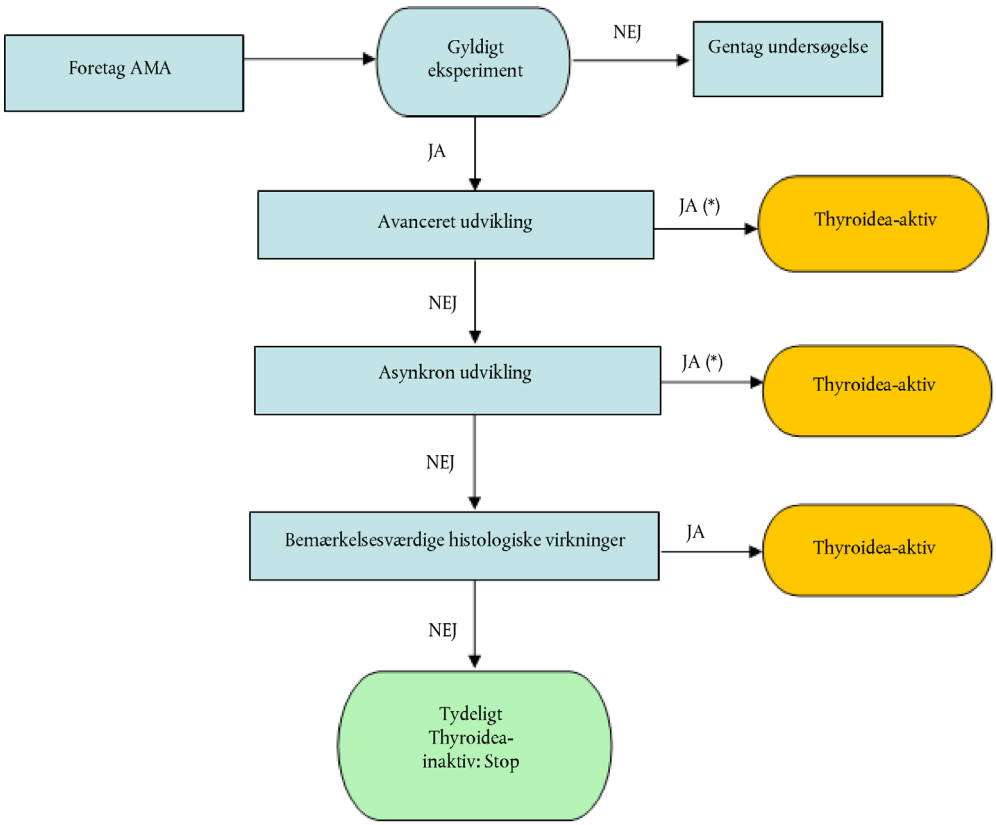
Beslutningsforløb for gennemførelse af AMA

46. Beslutningsforløbet blev udviklet for AMA for at yde logisk bistand til gennemførelse og fortolkning af resultaterne af bioassayet (se fremgangsmåde i figur 3). Beslutningsforløbet vægter grundlæggende endepunkterne i den avancerede udvikling, asynkrone udvikling og histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen tungt, mens forsinket udvikling, snude-til-gat-længde og kropsvægt (våd), som er parametre, der potentielt kan påvirkes af generel toksicitet, vejer mindre tungt.

▼M6

Figur 3

Beslutningsforløb for gennemførelse af AMA



(*) Nogle tilsynsmyndigheder kan kræve en histologisk analyse til trods for betydelige forskelle i avanceret og asynkron udvikling. Den enhed, der udfører denne test, opfordres til at rådføre sig med de nødvendige myndigheder forud for udførelsen af testen for at fastslå, hvilke endepunkter der kræves.

Avanceret udvikling (bestemt gennem udviklingsstadium, snude-til-gat-længde (SVL) og baglemslængde (HLL)

47. Avanceret udvikling vides kun at forekomme gennem virkninger, som er knyttet til thyreoideahormonet. Disse kan være virkninger på perifert væv såsom direkte interaktion med thyreoideahormonreceptoren (som med T4) eller virkninger, der forandrer niveauet af cirkulerende thyreoideahormoner. I begge tilfælde anses det for tilstrækkeligt bevis for, at kemikaliet er thyreoideaaktivt. Avanceret udvikling vurderes på en af to måder. For det første kan det generelle udviklingsstadium vurderes under anvendelse af den standardiserede tilgang, som er beskrevet nærmere hos Nieuwkoop og Faber (8). For det andet kan særlige morfologiske træk kvantificeres såsom baglemslængde på både dag 7 og 21, som associeres positivt med agonistiske virkninger på thyreoideahormonreceptoren. Hvis der forekommer statistisk signifikante fremskridt i udvikling eller bagbenslængde, viser testen, at kemikaliet er thyreoideaaktivt.

▼**M6**

48. Vurderingen af forsøgsdyr for forekomst af fremskyndet udvikling i forhold til kontrolpopulationen baseres på resultater af statistiske analyser udført for følgende fire endepunkter:

— baglemslængde (normaliseret ved SVL) på undersøgelsens dag 7

— baglemslængde (normaliseret ved SVL) på undersøgelsens dag 21

— udviklingsstadium på undersøgelsens dag 7

— udviklingsstadium på undersøgelsens dag 21

49. Statistiske analyser af baglemslængde udføres på grundlag af målinger af længden af det venstre baglem. Baglemslængden normaliseres ved at beregne forholdet mellem et individs baglemslængde og snude-til-gat-længde. Herefter sammenlignes gennemsnittet af de normaliserede værdier for hvert behandlingsniveau. Fremskyndet udvikling vises ved en væsentlig stigning i gennemsnitlig baglemslængde (normaliseret) i en kemisk behandlingsgruppe sammenlignet med kontrolgruppen på undersøgelsesdag 7 og/eller undersøgelsesdag 21 (se tillæg 3).

50. Statistiske analyser af udviklingsstadium udføres på grundlag af bestemmelsen af udviklingsstadier ifølge de morfologiske kriterier beskrevet af Nieuwkoop og Faber (8). Det er tegn på fremskyndet udvikling, når der ved en »multi-quantal« analyse påvises en signifikant stigning i værdier for udviklingsstadium i en kemikaliebehandlingsgruppe sammenlignet med kontrolgruppen på undersøgelsesdag 7 og/eller undersøgelsesdag 21.

51. I AMA-testmetoden anses en signifikant virkning på et af de ovennævnte fire endepunkter for at være tilstrækkeligt til en positiv påvisning af fremskyndet udvikling. Det vil sige, at signifikante virkninger på baglemslængde på et bestemt tidspunkt ikke kræver underbygning af signifikante virkninger på baglemslængde på det alternative tidspunkt eller af signifikante virkninger på udviklingsstadium på dette bestemte tidspunkt. Endvidere kræver signifikante virkninger på udviklingsstadium på et bestemt tidspunkt ikke underbygning af signifikante virkninger på udviklingsstadium på det alternative tidspunkt eller af signifikante virkninger på baglemslængde på dette bestemte tidspunkt. Vægten af evidens for fremskyndet udvikling vil ikke desto mindre øges, hvis signifikante virkninger påvises for mere end et endepunkt.

Asynkron udvikling (bestemt gennem udviklingsstadiekriterier)

52. Asynkron udvikling er karakteriseret ved forstyrrelse af den relative timing af morfogenesen eller udvikling af forskellige væv hos en enkelt haletudse. Den manglende evne til klart at fastslå en organismes udviklingsstadium ved hjælp af rækken af morfologiske endepunkter, som anses for typiske for et givet stadium, viser, at vævene udvikler sig asynkront gennem metamorfosen. Asynkron udvikling er en indikator for thyreoideaaktivitet. De eneste kendte virkningsmekanismer, som forårsager asynkron udvikling, er gennem kemikaliers virkninger på perifer thyreoideahormonfunktion og/eller thyreoideahormonmetabolisme i væv under udvikling, som det observeres med deiodinaseinhibitorer.

▼**M6**

53. Vurdering af forsøgsdyr for forekomst af asynkron udvikling i forhold til kontrolpopulationen skal være baseret på makroskopisk morfologisk vurdering af forsøgsdyrene på undersøgelsesdag 7 og undersøgelsesdag 21.

54. Nieuwkoop og Fabers (8) beskrivelse af en normal udvikling af Xenopus laevis danner rammerne for afdækning af en sekventiel rækkefølge for normal vævsremodellering. Udtrykket »asynkron udvikling« omhandler specifikt de afvigelser i makroskopisk morfologisk udvikling hos haletudser, som hindrer en endelig bestemmelse af et udviklingsstadium ifølge Nieuwkoop og Fabers kriterier (8), fordi centrale morfologiske kendetegn viser karakteristiske træk ved forskellige stadier.

55. Som det ligger i udtrykket »asynkron udvikling«, bør der kun tages hensyn til tilfælde af afvigelser i fremskridt med remodelleringen af specifikke væv i forhold til fremskridt med remodelleringen af andre væv. Nogle klassiske fænotyper omfatter forsinkelse eller fravær af frembrud af forlemmer til trods for normal eller fremskyndet udvikling af baglemmer og halevæv eller tidlig resorption af gæller i forhold til stadiet for baglemsmorfogenese og haleresorption. Et dyr vil blive registreret for at udvise asynkron udvikling, hvis det ikke kan knyttes til et bestemt stadium, fordi det ikke opfylder et flertal af afgørende udviklingskriterier for et givet stadium, jf. Niewkoop og Faber (8), eller hvis der er ekstrem forsinkelse eller fremskyndelse af et eller flere nøgletræk (f.eks. helt resorberet hale, men ingen frembrud af forlemmer). Denne vurdering udføres kvalitativt og omfatter hele rækken af afgørende kendetegn, jf. Nieuwkoop og Faber (8). Det er dog ikke nødvendigt at registrere udviklingsstatus for de forskellige afgørende kendetegn ved de dyr, som observeres. Dyr, der registreres for at udvise asynkron udvikling, knyttes ikke til et udviklingsstadium i henhold til Nieuwkoop og Faber (8)

56. Et centralt kriterium for at betegne tilfælde af abnorm morfologisk udvikling som »asynkron udvikling« er, at den relative timing af vævsremodellering og vævsmorfogenese er forstyrret, mens de berørte vævs morfologi ikke er åbenlyst abnorm. Et eksempel til at illustrere denne fortolkning af makroskopiske morfologiske abnormiteter er, at forsinket baglemsmorfogenese i forhold til udviklingen af andre væv vil opfylde kriteriet for »asynkron udvikling«, mens tilfælde af manglende baglemmer, abnorme fingre eller tæer (f.eks. ektrodaktylia, polydaktylia) eller andre åbenlyse misdannelser af lemmer ikke skal betragtes som »asynkron udvikling«.

57. I den forbindelse bør de vigtigste morfologiske kendetegn, der skal vurderes for deres koordinerede metamorfiske fremskridt, omfatte baglemsmorfogenese, forlemsmorfogenese, forlemsfrembrud, stadiet for haleresorption (især resorption af halefinne) og hovedmorfologi (f.eks. gællestørrelse og gælleresorptionsstadium, underkæbemorfologi, protrusion af Meckels brusk).

58. Alt efter den kemiske virkningsmåde kan der forekomme forskellige makroskopiske morfologiske fænotyper. Nogle klassiske fænotyper omfatter forsinkelse eller fravær af forlemsfrembrud til trods for normal eller fremskyndet udvikling af baglemmer og halevæv, tidlig resorption af gæller i forhold til remodellering af baglemmer og hale.

▼M6

Histopatologi

59. Hvis kemikaliet ikke forårsager åbenlys toksicitet og ikke fremskynder udviklingen eller forårsager asynkron udvikling, vurderes den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlerne ved hjælp af det rette vejledningsdokument (9). Udviklingsforsinkelse er — i fravær af toksicitet — en stærk indikator for aktivitet, der skader skjoldbruskkirtlen, men udviklingsstadieanalysen er mindre følsom og mindre diagnostisk end den histopatologiske analyse af skjoldbruskkirtlen. Derfor er det i dette tilfælde påkrævet at foretage histopatologiske analyser af skjoldbruskkirtlerne. Virkninger på skjoldbruskkirtlens histologi er blevet påvist i mangel af virkninger på udviklingen. Forekommer der ændringer i skjoldbruskkirtlens histologi, anses kemikaliet for at være thyreoideaaktivt. Hvis der ikke observeres udviklingsforsinkelser eller vævslæsioner i skjoldbruskkirtlerne, anses kemikaliet for at være thyreoideainaktivt. Begrundelsen for denne afgørelse er, at skjoldbruskkirtlen er under indflydelse af TSH, og et hvilket som helst kemikalie, som forandrer cirkulerende thyreoideahormoner tilstrækkeligt til at forandre TSH-sekretet, vil resultere i histopatologiske ændringer i skjoldbruskkirtlerne. Forskellige virkningsmåder og -mekanismer kan forandre cirkulerende thyreoideahormon. Så selv om thyreoideahormonniveauet viser en skjoldbruskkirtelrelateret virkning, er det utilstrækkeligt til at fastslå, hvilken virkningsmåde eller -mekanisme der hænger sammen med reaktionen.

60. Da dette endepunkt ikke egner sig til grundlæggende statistiske metoder, skal bestemmelsen af en virkning i forbindelse med eksponeringen for et kemikalie foretages ved ekspertudtalelse fra en patolog.

Forsinket udvikling (bestemt gennem udviklingsstadie, HLL, kropsvægt (BW), SLV)

61. Forsinket udvikling kan forekomme på grund af mekanismer, der skader skjoldbruskkirtlen, og indirekte toksicitet. En lidt forsinket udvikling sammen med åbenlyse tegn på toksicitet viser sandsynligvis en ikkespecifik toksisk virkning. Vurdering af toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen er et væsentligt element i forsøget for at mindske sandsynligheden for falske positive resultater. Overdødelighed er et klart tegn på, at der forekommer andre toksiske mekanismer. Tilsvarende tyder lette vækstreduktioner, som bestemmes af vådvægt og/eller SVL-længde også på toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Tilsyneladende vækststigninger observeres i almindelighed med kemikalier, som påvirker normal udvikling negativt. Som følge heraf viser forekomsten af større dyr ikke nødvendigvis toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Man bør imidlertid aldrig udelukkende basere sig på vækst for at bestemme toksicitet i skjoldbruskkirtlen. Vækst bør snarere bruges sammen med udviklingsstadium og histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen til at bestemme thyreoideaaktivitet. Andre endepunkter bør også inddrages ved bestemmelse af åbenlys toksicitet, herunder ødemer, hæmoragiske læsioner, sløvhed, nedsat fødeindtagelse, uregelmæssig/ændret svømmeadfærd osv. Viser alle testkoncentrationer tegn på åbenlys toksicitet, revurderes testkemikaliet ved lavere testkoncentrationer, før det fastslås, om kemikaliet er potentielt thyreoideaaktivt eller -inaktivt.

62. Statistisk signifikante udviklingsforsinkelser viser — i mangel af andre tegn på åbenlys toksicitet — at kemikaliet er thyreoideaaktivt (antagonistisk). I mangel af stærke statistiske reaktioner kan dette resultat suppleres af resultater fra en histopatologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen.

▼M6

Statistiske analyser

63. Statistiske dataanalyser skal helst følge de procedurer, der er beskrevet i dokumentet Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (11). For alle kontinuerte kvantitative endepunkter (HLL, SVL, vådvægt), som er i overensstemmelse med en monoton dosisrespons, anvendes Jonckheere-Terpstra-testen på en nedadgående måde for at fastslå en signifikant behandlingseffekt.

64. For kontinuerte endepunkter, der ikke er i overensstemmelse med en monoton dosisrespons, vurderes dataene for normalitet (fortrinsvis ved hjælp af Shapiro-Wilk- eller Anderson-Darling-testen) og varianshomogenitet (fortrinsvis ved hjælp af Levene-testen). Begge test udføres på residualer fra en ANOVA. Ekspertvurderinger kan bruges i stedet for disse formelle test for normalitet og varianshomogenitet, selv om formelle test foretrækkes. Konstateres der ikkenormalitet eller variansheterogenitet, bør der søges en normaliserende, variansstabiliserende transformation. Hvis dataene (eventuelt efter en transformation) er normalt fordelt med homogen varians, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Dunnett's test. Hvis dataene (eventuelt efter en transformation) er normalt fordelt med heterogen varians, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Tamhane-Dunnett- eller T3-testen eller ved Mann-Whitney-Wilcoxon U-testen. Kan der ikke konstateres en normaliserende transformation, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved Mann-Whitney-Wilcoxon U-testen ved hjælp af en Bonferroni-Holm-tilpasning til p-værdierne. Dunnett-testen anvendes uafhængigt af en ANOVA F-test, og Mann-Whitney-testen anvendes uafhængigt af en overordnet Kruskall-Wallis-test.

65. Signifikant dødelighed forventes ikke, men vurderes ved Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor dataene er i overensstemmelse med dosis/respons-monotoni og ellers ved Fisher's Exact-test med en Bonferroni-Holm-tilpasning.

66. En signifikant behandlingseffekt for udviklingsstadium bestemmes ved at anvende Jonckheere-Terpstra-testen på en nedadgående måde på replikaternes medianer. Alternativt, og fortrinsvis, anvendes Jonckheeres »multiquantal test« fra den 20. til den 80. percentil til bestemmelse af virkning, da den tager hensyn til ændringer i fordelingsprofilen.

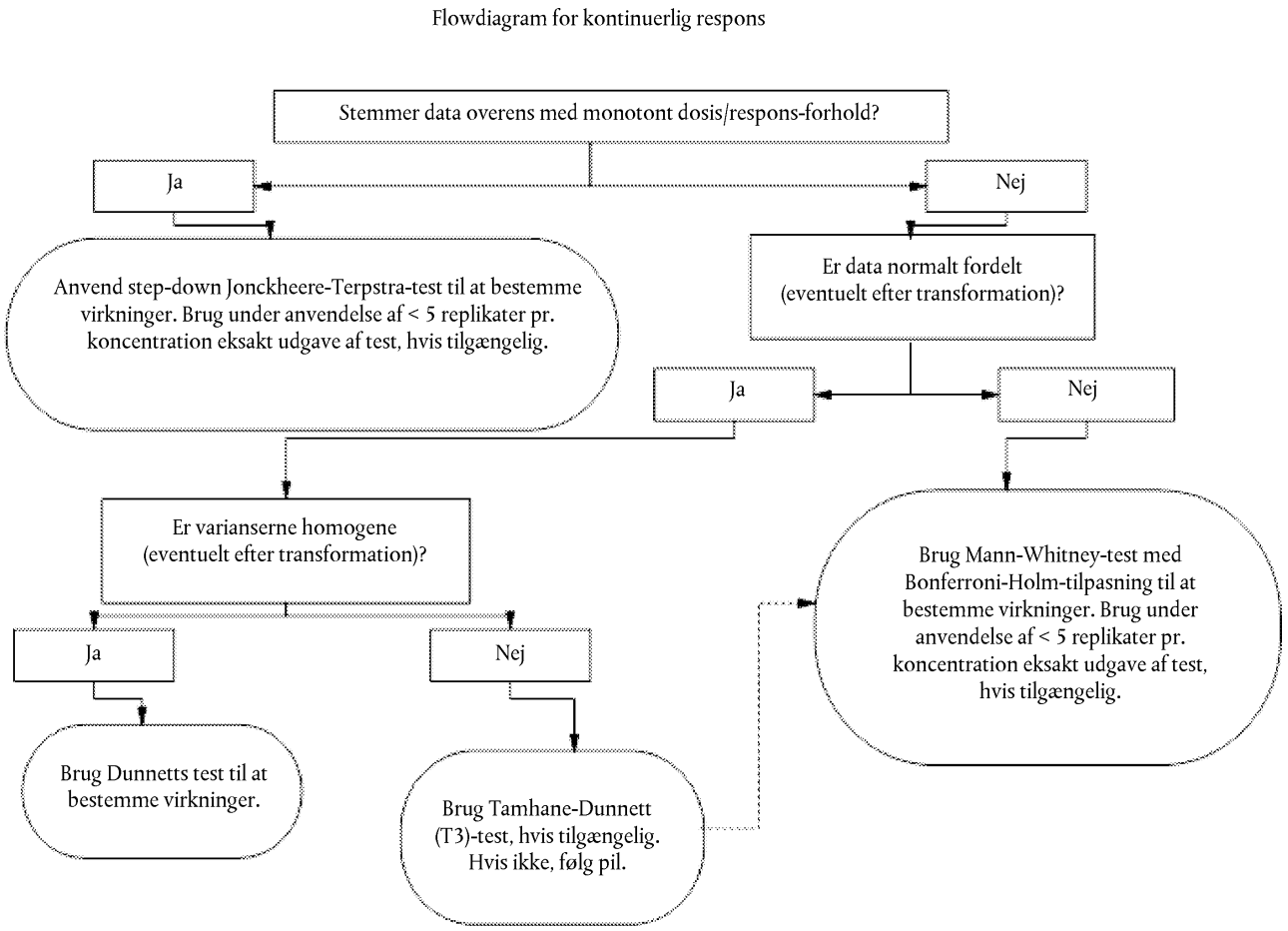
67. Den rette analyseenhed er replikatet, så dataene består af medianer fra replikatet, hvis Jonckheere-Terpstra- eller Mann-Whitney U-testen benyttes, eller gennemsnit fra replikatet, hvis Dunnett's test benyttes. Dosis/respons-monotoni kan vurderes visuelt fra replikatet og middelværdierne for behandlingerne eller medianer eller fra formelle test som tidligere beskrevet (11). Med under fem replikater pr. behandling eller kontrolgruppe bør de nøjagtige permutationsversioner af Jonckheere-Terpstra- og Mann-Whitney-testene benyttes, hvis de er tilgængelige. Den statistiske signifikans af alle angivne test vurderes ved signifikansniveau 0,05.

68. Figur 4 er et flowdiagram for udførelse af statistiske test på kontinuerte data.

▼M6

Figur 4

Flowdiagram over statistiske metoder for data om kontinuerlig respons



02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Særlige overvejelser over dataanalyse

Brug af kompromitterede behandlingsniveauer

69. Der skal tages hensyn til flere faktorer, når det bestemmes, om et replikat eller en hel behandling påviser åbenlys toksicitet og skal fjernes fra analysen. Åbenlys toksicitet defineres som en dødelighed > 2 i ethvert replikat, der kun kan forklares ved toksicitet snarere end teknisk fejl. Andre tegn på åbenlys toksicitet omfatter blødning, abnorm adfærd, abnorme svømmemønstre, anoreksi og andre kliniske sygdomstegn. For subletale tegn på toksicitet kan kvalitative vurderinger være nødvendige og skal altid foretages i forhold til kontrolgruppen med rent vand.

Opløsningsmiddelkontroller

70. Opløsningsmidler bør kun bruges som sidste udvej, når alle andre muligheder for kemikalietilførsel er overvejet. Hvis der bruges et opløsningsmiddel, skal der samtidig være en kontrolgruppe med rent vand. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger. Dette sker ved en statistisk sammenligning af kontrolgruppen med opløsningsmiddel og kontrolgruppen med rent vand. De mest relevante endepunkter, der skal behandles i denne analyse, er udviklingsstadium, SVL og vådvægt, da disse kan påvirkes gennem former for toksicitet uden for skjoldbruskkirtlen. Hvis der konstateres statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem kontrolgruppen med rent vand og kontrolgruppen med opløsningsmiddel, bestemmes undersøgelsens endepunkter for responsmålingerne ved hjælp af kontrolgruppen med rent vand. Hvis der ikke er nogen statistisk signifikant forskel mellem kontrolgruppen med rent vand og kontrolgruppen med opløsningsmiddel for alle målte responsvariable, bestemmes undersøgelsens endepunkter for responsmålingerne ved hjælp af det opsamlede fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontrollerne.

Behandlingsgrupper, som når udviklingsstadium 60 og derover

71. Efter stadium 60 er haletudsernes størrelse og vægt mindsket på grund af vævsresorption og reduktion af absolut vandindhold. Målinger af vådvægt og SVL kan således ikke bruges hensigtsmæssigt i statistiske analyser med henblik på forskelle i vækstrater. Derfor bør vådvægts- og længdedata fra organismer > NF60 bortcensureres og kan ikke bruges i analyser af gennemsnit eller medianer fra replikater. To forskellige metoder kan bruges til at analysere disse vækstrelaterede parametre.

72. En metode er kun at se på haletudser med udviklingsstadier under eller svarende til stadium 60 ved statistiske analyser af vådvægt og/eller SVL. Denne metode menes at give tilstrækkeligt fyldestgørende information om alvoren af mulige vækstvirkninger, så længe en lille del af forsøgsdyrene fjernes fra analyserne (≤ 20 %). Såfremt et øget antal haletudser udviser en udvikling over stadium 60 (≥ 20 %) i en eller flere nominelle koncentration(er), bør der foretages en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur på alle haletudser for at vurdere vækstvirkninger som følge af kemisk behandling, samtidig med at der tages hensyn til, hvordan udvikling i et sent stadium påvirker væksten. Tillæg 3 indeholder vejledning i tofaktor-ANOVA-analyse af vægt og længde.

LITTERATUR

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) M.D. Kahl, C.L. Russom, D.L. DeFoe og D.E. Hammermeister (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, s. 539-551

(8) P.D. Nieuwkoop og J. Faber (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) M.H.I. Dodd og J.M. Dodd (1976) Physiology of Amphibia. B. Lofts (ed.), Academic Press, New York, s. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) T.H. Hutchinson, N. Shillabeer, M.J. Winter og D.B. Pickford, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

▼M6

Tillæg 1

Tabel 1

Forsøgsbetingelser for det 21 dage lange Amphibian Metamorphosis Assay

Forsøgsdyr		Xenopus laevis-larver	
Første larvestadium		Nieuwkoop og Faber stadium 51	
Eksponeringsperiode		21 dage	
Kriterier for udvælgelse af larver		Udviklingsstadium og samlet længde (valgfri)	
Testkoncentrationer		Minimum 3 koncentrationer, der spænder over ca. en størrelsesorden	
Eksponering		Gennemstrømning (foretrækkes) og/eller statisk udskiftning	
Testsystemets gennemstrømningshastighed		25 ml/min. (fuldstændig udskiftning af volumen ca. hver 2,7 time)	
Primære endepunkter / Bestemmelsesdage		Dødelighed	Dagligt
		Udviklingsstadium	D 7 og 21
		Baglemslængde	D 7 og 21
		Snude-gat-længde	D 7 og 21
		Kropsvægt (våd)	D 7 og 21
		Histologisk undersøgelse af thyreoidea	D 21
Fortyndingsvand / Laboratoriekontrol		Afkloret ledningsvand (trækulsfiltreret) eller tilsvarende laboratoriekilde	
Larvetæthed		20 larver / testbeholder (5 / l)	
Testopløsning / Testbeholder		4-10 l (minimum 10-15 cm vand) / Testbeholder af glas eller rustfrit stål (f.eks. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Gengivelse		4 testbeholdere til replikat / testkoncentration og kontrolprøve	
Acceptabel dødelighed i kontrollerne		≤ 10 % pr. replikattestbeholder	
Fiksering af skjoldbruskkirtel	Fikseret antal	Alle haletudser (5/replikat vurderes først)	
	Område	Hoved eller hele kroppen	
	Fikseringsmiddel	Davidson's fikseringsmiddel	
Fodring	Foder	Sera Micron® eller tilsvarende	
	Mængde / Frekvens	Se tabel 1 for fodringhyppighed med Sera Micron®	
Belysning	Lysperiode	12 timers lys: 12 timers mørke	

▼**M6**

	Intensitet	600-2 000 lux (målt ved vandoverfladen)
Vandtemperatur		22 ° ± 1 °C
pH		6,5-8,5
Koncentration af opløst ilt (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % luftmætning)
Tidsplan for kemiske analyseprøver		En gang om ugen (4 prøver pr. test)

▼**M6**

Tillæg 2

Indberetningsskemaer til rådata og oversigtsdata

Tabel 1

Generelle oplysninger om testkemikalie

Kemisk information			
	Indfør testkemikalie, koncentrationsenheder og behandlinger		
	Testkemikalie:		
	Koncentrationsenheder:		
	Behandling 1		
	Behandling 2		
	Behandling 3		
	Behandling 4		
	Dato (dag 0):		Indfør dato (mm/dd/åå)
	Dato (dag 7):		Indfør dato (mm/dd/åå)
	Dato (dag 21):		Indfør dato (mm/dd/åå)

Tabel 2

Skemaer til indsamling af rådata for dag 7 og dag 21

DAG X
DATO 00/00/00

	Koncentration	Behandlingsnummer	Replikatnummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklingsstadium	SVL-længde (mm)	Baglemslængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Koncentration	Behandlingsnummer	Replikatnummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklingsstadium	SVL-længde (mm)	Baglemslængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Koncentration	Behandlingsnummer	Replikatnummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklingsstadium	SVL-længde (mm)	Baglemslængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Koncentration	Behandlingsnummer	Replikatnummer	Individuelt nummer	Individuel indikator	Udviklingsstadium	SVL-længde (mm)	Baglemslængde (mm)	Hele organismens vægt (våd) (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabel 3

Beregnede oversigter for endepunktsdata fra dag 7 og dag 21

		Udviklingsstadium			SVL (mm)		Baglemslængde (mm)		Vægt (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDIAN	MAX	GNSN	STD DEV	GNSN	STD DEV	GNSN	STD DEV
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindførsler i tabel 2

Tabel 4

Daglige data om dødelighed

Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Værdi!																
2	#Værdi!																
3	#Værdi!																
4	#Værdi!																
5	#Værdi!																

▼**M6**

Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Værdi!																
7	#Værdi!																
8	#Værdi!																
9	#Værdi!																
10	#Værdi!																
11	#Værdi!																
12	#Værdi!																
13	#Værdi!																
14	#Værdi!																
15	#Værdi!																
16	#Værdi!																
17	#Værdi!																
18	#Værdi!																
19	#Værdi!																
20	#Værdi!																
21	#Værdi!																
Optælling af replikater		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Optælling af behandlinger		0				0				0				0			

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindførsler i tabel 1.

Tabel 5

Vandkvalitetskriterier

Eksponeringssystem (gennemstrømning/statisk udskiftning):
Temperatur:
Lysintensitet:
Lys-/mørkecyklus:
Foder:
Fodermængde:
Vandets pH:
Iodkoncentration i testvandet:

▼**M6**

Tabel 6

Oversigt over kemiske data

Kemisk navn:																				
Cas #:																				
Testdag	Dato:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Værdi!																				
2	#Værdi!																				
3	#Værdi!																				
4	#Værdi!																				
5	#Værdi!																				
6	#Værdi!																				
7	#Værdi!																				
8	#Værdi!																				
9	#Værdi!																				
10	#Værdi!																				
11	#Værdi!																				
12	#Værdi!																				
13	#Værdi!																				
14	#Værdi!																				
15	#Værdi!																				
16	#Værdi!																				
17	#Værdi!																				
18	#Værdi!																				
19	#Værdi!																				
20	#Værdi!																				
21	#Værdi!																				

Bemærk: Celleberegninger er knyttet til dataindførsler i tabel 1.

▼**M6**

Tabel 7

Indberetningsskemaer vedrørende histopatologi for centrale kriterier

Dato: Kemikalie:

Kontroldyr ID — replikat 1	Kontroldyr ID — replikat 2	Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)	Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)	Follikelcellehypertrofi	Follikelcellehyperplasi
i alt:					

Dosis dyr ID — replikat 1	Dosis dyr ID — replikat 2	Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)	Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)	Follikelcellehypertrofi	Follikelcellehyperplasi
i alt:					

Patolog:

Dosis dyr ID — replikat 1	Dosis dyr ID — replikat 2	Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)	Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)	Follikelcellehypertrofi	Follikelcellehyperplasi
i alt:					

Dosis dyr ID — replikat 1	Dosis dyr ID — replikat 2	Forstørret skjoldbruskkirtel (hypertrofi)	Formindsket skjoldbruskkirtel (atrofi)	Follikelcellehypertrofi	Follikelcellehyperplasi
i alt:					

▼**M6**

Tabel 8

Supplerende histopatologiske kriterier

Dato: Kemikalie: Patolog:

Kontroldyr ID — replikat 1		Follikulært lumenområde stigning	Follikulært lumenområde fald
Kontroldyr ID — replikat 2			
i alt:			

Dosis dyr ID — replikat 1		Follikulært lumenområde stigning	Follikulært lumenområde fald
Dosis dyr ID — replikat 2			
i alt:			

Dosis dyr ID — replikat 1		Follikulært lumenområde stigning	Follikulært lumenområde fald
Dosis dyr ID — replikat 2			
i alt:			

Dosis dyr ID — replikat 1		Follikulært lumenområde stigning	Follikulært lumenområde fald
Dosis dyr ID — replikat 2			
i alt:			

▼**M6**

Tabel 9

Forklarende beskrivelser for histopatologiske fund

Dato:

Kemikalie:

Patolog:

		Forklarende beskrivelse
Kontroldyr ID — replikat 1		
Kontroldyr ID — replikat 2		
Dosis dyr ID — replikat 1		
Dosis dyr ID — replikat 2		

▼**M6**

Dosis dyr ID — replikat 1		
Dosis dyr ID — replikat 2		
Dosis dyr ID — replikat 1		
Dosis dyr ID — replikat 2		

▼M6

Tabel 10

Oversigt over skabelon til indberetningsskema for dag x (7 eller 21) i AMA

		Kontrol				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
Endepunkt	Replikat	Middel	SD	VK	N	Middel	SD	VK	N	p-værdi	Middel	SD	VK	N	p-værdi	Middel	SD	VK	N	p-værdi
Baglem Længde (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			
Vådvægt (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2238

▼M6

Tabel 11

Oversigt over skabelon til indberetningsskema for dag x (7 eller 21) udviklingsstadiedata for AMA

		Kontrol				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
	Replikat	Median	Min	Max	N	Median	Min	Max	N	p-værdi	Median	Min	Max	N	p-værdi	Median	Min	Max	Median	p-værdi
Udviklings-stadie	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Middel:																			

▼M6

Tillæg 3

Alternativ analyse af vægt og længde i tilfælde af, at sen stadieudvikling gælder for over 20 % af haletudserne i en eller flere koncentration(er)

Såfremt et relativt stort antal haletudser udviser en udvikling over stadium 60 (≥ 20 %) i en eller flere nominelle koncentration(er), bør der foretages en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur på alle haletudser for at vurdere vækstvirkninger som følge af kemisk behandling, samtidig med at der tages hensyn til, hvordan udvikling i et sent stadium påvirker væksten.

Det foreslås at bruge alle data, men tage hensyn til virkningen af udvikling i et sent stadium. Dette kan gøres med en tofaktor-ANOVA med en indlejret variansstruktur. Definer SentStadie=»Ja« for et dyr, hvis dets udviklingsstadium er 61 eller derover. Ellers definer SentStadie=»Nej«. Herefter kan der foretages en tofaktor-ANOVA med koncentration og SentStadie og deres vekselvirkning med Rep(Konc) en vilkårlig faktor og Haletudse(Rep) en anden vilkårlig virkning. Dette behandler stadig replikatet som analyseenheden og giver i al væsentlighed de samme resultater som en vægtet analyse af rep*sentstadie-gennemsnit, vægtet med antallet af dyr pr. gennemsnit. Hvis dataene ikke opfylder ANOVA's normalitets- eller varianshomogenitetskrav, kan der foretages en normaliseret rangordenstransformation for at fjerne denne indsigelse.

Ud over standard-ANOVA F-test for virkningerne af Conc, SentStadie og vekselvirkningerne mellem dem, kan vekselvirknings-F-testen »deles« i to supplerende ANOVA F-test, en vedrørende de gennemsnitlige responser på tværs af koncentrationer for SentStadie=»Nej« og en anden vedrørende gennemsnitsresponserne på tværs af koncentrationer for SentStadie=»Ja«. Yderligere sammenligninger af middelværdier for behandlingen i forhold til kontroller foretages inden for hvert enkelt SentStadie-niveau. En tendenstypeanalyse kan foretages ved hjælp af passende kontraster, eller der kan foretages simple parvise sammenligninger, hvis der er evidens for ikkemonoton dosisrespons inden for et niveau af SentStadie-variabel. En Bonferroni-Holm-tilpasning til p-værdierne foretages kun, hvis den tilsvarende F-skive ikke er signifikant. Dette kan gøres i SAS og — formentlig — andre statistiske softwarepakker. Der kan opstå komplikationer, når der i nogle koncentrationer ikke er dyr i et sent stadium, men disse situationer kan håndteres på en enklere måde.

▼**M6**

Tillæg 4

Definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M6

C.39. COLLEMBOLFORMERINGSTEST I JORD

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 232 (2009). Denne testmetode er designet til at vurdere virkningerne af kemikalier på collembolers (springhalers) formeringsevne i jord. Den er baseret på eksisterende procedurer (1) (2). Den partenogenetiske Folsomia candida og seksuelt reproducerende Folsomia fimetaria er to af de mest tilgængelige collembolarter, og de kan dyrkes og kan fås i handelen. Når specifikke habitater, som ikke er dækket af de to arter, skal vurderes, kan fremgangsmåden også udvides til andre collembolarter, hvis de kan opfylde testens validitetskriterier.

2. Jordboende collemboler er økologisk relevante arter til økotoksikologiske test. Collemboler er heksapoder med et tyndt luft- og vandgennemtrængeligt exoskelet og repræsenterer leddyrarter med en anden eksponeringsvej og grad sammenlignet med regnorme og enchytraeider.

3. Collembolers populationstætheder når i almindelighed op på 10^5 m^{-2} i jord- og førnlag i mange terrestriske økosystemer (3) (4). Voksne individer måler typisk 0,5-5 mm, og deres bidrag til den samlede jordbaserede animalske biomasse og respiration er lavt, anslået 1-5 % (5). Deres vigtigste rolle kan derfor være som potentielle regulatorer af processer gennem mikrobe- og mikrofaunaprædation. Springhaler er byttedyr for en bred vifte af hvirvelløse dyr under og over jorden såsom mider, tusindben, edderkopper, løbebiller (Carabidae) og rovbiller. Collemboler bidrager til nedbrydningsprocesser i sur jordbund, hvor de kan være de vigtigste jordlevende hvirvelløse dyr ud over enchytraeider, eftersom regnorme og diplopoder normalt er fraværende.

4. F. fimetaria findes i hele verden og er almindelig i flere jordtyper fra sandede til lerede jorde og fra muld- til morjorde. Det er en øjeløs upigmenteret collembol. Den er registreret i landbrugsjorde over hele Europa (6). Den er altædende og spiser bl.a. svampehyfer, bakterier, protozoer og affald i sin føde. Den interagerer gennem græsning med infektioner af plantepatogene svampe (7) og kan påvirke mykorrhiza, som det vides at være tilfældet for F. candida. Som de fleste collembolarter formerer den sig seksuelt, hvilket kræver en permanent tilstedeværelse af hanner til befrugtning af æg.

5. F. candida findes også i hele verden. Skønt den ikke er almindelig i de fleste naturlige jorde, forekommer den ofte i meget høje antal på humusrige steder. Det er en øjeløs upigmenteret collembol. Den har en veludviklet »furca« (springorgan) og en aktiv løbebevægelse og springer let, hvis den forstyrres. F. candidas økologiske rolle ligner F. fimetarias, men habitaterne er rigere på organisk materiale. Den har partenogenetisk formering. Hanner kan forekomme med under en pr. tusind.

PRINCIP FOR TESTEN

6. Synkrone voksne collemboler (F. fimetaria) eller collembolyngel (F. candida) eksponeres for en række koncentrationer af testkemikaliet blandet i en modificeret syntetisk jord (8) med et indhold på 5 % organisk stof (eller en alternativ jord). Testscenariet kan inddeles i to trin:

— en forberedende test, såfremt der ikke foreligger tilstrækkelig information om toksicitet, hvor dødelighed og reproduktion er de vigtigste

▼M6

endepunkter, der vurderes efter to uger for F. fimetaria og tre uger for F. candida

— en endelig reproduktionstest, hvor den samlede mængde afkom frembragt af forældredyr og forældredyrenes overlevelse vurderes. Denne endelige test varer tre uger for F. fimetaria eller fire uger for F. candida.

Testkemikaliets toksiske virkning på voksnes dødelighed og formeringsevne udtrykkes som LC_x og EC_x ved at tilpasse dataene til en passende model ved ikkelineær regression for at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage henholdsvis en dødelighed eller et fald i formeringsevne på x % eller alternativt som NOEC-/LOEC-værdi (9).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Testkemikaliets fysiske egenskaber, vandopløselighed, K_{ow}, fordelingskoefficient mellem jord og vand og damptryk skal helst være kendt. Yderligere oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord, såsom fotolyse- og hydrolysehastigheder, og biotisk nedbrydning er ønskelige. Kemisk identifikation af testkemikaliet ifølge IUPAC-nomenklaturen, CAS-nummer, parti, batch, strukturformel og renhed dokumenteres, når det foreligger.

8. Denne testmetode kan benyttes til vandopløselige eller -uopløselige kemikalier. Dog vil tilsætningsmåden for testkemikaliet variere som følge heraf. Testmetoden kan ikke anvendes på flygtige kemikalier, dvs. kemikalier, for hvilke Henrys konstant eller luft-vandfordelingskoefficienten er større end en, eller kemikalier, for hvilke damptrykket overstiger 0,0133 Pa ved 25 °C.

TESTENS VALIDITET

9. Følgende kriterier skal opfyldes i de ubehandlede kontroller, hvis testresultatet skal anses for gyldigt:

— Den gennemsnitlige dødelighed blandt voksne individer må ikke overstige 20 % ved testens afslutning.

— Det gennemsnitlige antal unge individer pr. beholder bør være mindst 100 ved forsøgets afslutning.

— Variationskoefficienten beregnet for antal unge individer bør være under 30 % ved afslutningen af den endelige test.

REFERENCEKEMIKALIE

10. Et referencekemikalie bør med jævne mellemrum testes ved sin EC_{50}-koncentration for den valgte prøvejordtype eller muligvis inkluderes i hver test for at kontrollere, at testorganismerne i testsystemet ligger inden for det normale niveau. Et egnet referencekemikalie er borsyre, som bør nedbringe formeringsevnen med 50 % (10) (11) ved omkring 100 mg pr. kg jord (tørvægt) for begge arter.

BESKRIVELSE AF TESTEN

Testbeholdere og -udstyr

11. Beholdere, som kan rumme 30 g fugtig jord, er egnede testbeholdere. Materialet bør enten være glas eller inert plast (ikketoksisk). Det bør dog undgås at bruge plastbeholdere, hvis eksponeringen for testkemikaliet sænkes på grund af sorption. Testbeholderne bør have et tværsnitsareal, som giver en faktisk jorddybde i testbeholderen på 2-4 cm. Beholderne

▼M6

bør have låg (f.eks. glas eller polyethylen), der er designet til at reducere vandfordampning, samtidig med at der kan ske en gasudveksling mellem jord og atmosfære. Beholderen bør i det mindste være delvis gennemsigtig for at sikre lysgennemtrængelighed.

12. Der kræves normalt laboratorieudstyr, specielt følgende:

— tørreskab

— stereomikroskop

— pH-meter and luxmeter

— egnede nøjagtige vægte

— passende udstyr til temperaturkontrol

— passende udstyr til luftfugtighedskontrol (ikke væsentligt, hvis eksponeringsbeholderne er dækket af låg)

— temperaturstyret inkubator eller lille rum

— pincetter eller en lavtsugende luftgennemstrømningsanordning.

Fremstilling af testjord

13. Der anvendes en modificeret syntetisk jord (8) med et indhold af organisk materiale på 5 %. Alternativt kan der anvendes en naturlig jord, da den syntetiske jord ikke ligner naturlige jordtyper. Den anbefalede sammensætning af den syntetiske jord er som følger (baseret på tørvægt, tørret til en konstant vægt ved 105 °C):

— 5 % sphagnum, lufttørret og findelt (en partikelstørrelse på 2 ± 1 mm er acceptabel)

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

— ca. 74 % lufttørret industrisand (afhængigt af den nødvendige mængde $CaCO_3$) overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 µm. Den nøjagtige mængde sand afhænger af mængden af $CaCO_3$ (se nedenfor), idet de til sammen skal ligge på 75 %.

— 1,0 % calciumcarbonat ($CaCO_3$, pulveriseret, analysekvalitet) for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5. Hvor meget calciumcarbonat der skal tilsættes, afhænger primært af sphagnummens kvalitet/art (se bemærkning 1).

Bemærkning 1: Den nødvendige mængde $CaCO_3$ vil afhænge af jordsubstratets bestanddele og bestemmes ved at måle pH-værdien af præinkuberede fugtige delprøver af jord umiddelbart før testen.

Bemærkning 2: Det anbefales at måle pH-værdi og eventuelt C/N-forhold, kationudvekslingskapacitet (CEC) og indhold af organisk materiale i jorden for at sikre en normalisering på et senere tidspunkt og fortolke resultaterne bedre.

Bemærkning 3: Om nødvendigt, f.eks. til særlige testformål, kan naturlig jord fra uforurenede steder også bruges som test- og/eller dyrkningssubstrat. Anvendes der naturlig jord, bør det dog som minimum karakteriseres ved oprindelse (indsamlingssted), pH, tekstur (partikelstørrelsesfordeling), CEC og indhold af organisk materiale, og det bør være uden forurening. For naturlig jord anbefales det at påvise dens egnethed til en test og til at opfylde testvaliditetskriterierne, før jorden anvendes i en endelig test.

▼M6

14. De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratoriemixer). Den syntetiske jords maksimale vandholdende evne (WHC) bestemmes i overensstemmelse med procedurerne beskrevet i tillæg 5. Testjordens fugtindhold optimeres for at opnå en løs porøs jordstruktur, så collembolerne kan komme ind i porerne. Dette er normalt mellem 40-60 % af den maksimale vandholdende evne.

15. Den tørre syntetiske jord fugtes på forhånd ved at tilsætte deioniseret vand nok til at opnå omkring halvdelen af det endelige vandindhold 2-7 dage før testens start med henblik på at ækvilibrere/stabilisere surhedsgraden. Til bestemmelse af pH-værdien anvendes en blanding af jord og en opløsning på 1 M kaliumchlorid (KCl) eller 0,01 M calciumchlorid ($CaCl_2$) i forholdet 1:5 (ifølge tillæg 6). Hvis jorden er mere sur end det krævede område, kan den justeres ved tilsætning af en passende mængde $CaCO_3$. Hvis jorden er for basisk, kan den justeres ved tilsætning af en uorganisk syre, der ikke skader collemboler.

16. Den fugtede jord opdeles i portioner svarende til antallet af testkoncentrationer (og eventuelt referencekemikalie) og kontroller, der benyttes til testen. Testkemikalierne tilsættes, og vandindholdet reguleres ifølge punkt 24.

Udvælgelse og klargøring af forsøgsdyr

17. Den partenogenetiske F. candida er den anbefalede art, da denne art i ringtesten af testmetoden (11) opfyldte validitetskriterierne for overlevelse oftere end F. fimetaria. Anvendes der en alternativ art, skal den opfylde de i punkt 9 anførte validitetskriterier. Ved testens begyndelse skal dyrene være godt opfodrede og være 23-26 dage for *F. fimetaria* og 9-12 dage for *F. candida*. For hvert replikat bør der for F. fimetaria *være 10 hanner og 10 hunner, og for* F. candida anvendes 10 hunner (se tillæg 2 og tillæg 3). De synkrone dyr udvælges tilfældigt fra skålene, og deres sundhed og fysiske tilstand kontrolleres for hvert parti, der tilsættes et replikat. Hver gruppe på 10/20 individer tilsættes til en tilfældigt udvalgt testbeholder, og de store hunner af F. fimetaria udvælges for at sikre en korrekt skelnen fra *F. fimetaria*-hanner.

Fremstilling af testkoncentrationer

18. Der kan benyttes fire metoder til tilsætning af testkemikaliet: 1) blanding af testkemikaliet i jorden med vand som bærestof, 2) blanding af testkemikaliet i jorden med et organisk opløsningsmiddel som bærestof, 3) blanding af testkemikaliet i jorden med sand som bærestof eller 4) påføring af testkemikaliet på jordoverfladen. Valget af den egnede metode afhænger af kemikaliets kendetegn og formålet med testen. Generelt anbefales det at blande testkemikaliet i jorden. Tilførselsprocedurer, som er i overensstemmelse med den praktiske anvendelse af testkemikaliet, kan dog være påkrævet (f.eks. sprøjtning af flydende formulering eller brug af særlige pesticidformuleringer såsom granulat- eller frøbehandlinger). Jorden behandles, før collembolerne tilsættes, undtagen når testkemikaliet tilsættes til jordoverfladen, hvor collembolerne skal have lov til at komme ned i jorden.

Vandopløseligt testkemikalie

19. En opløsning af testkemikaliet fremstilles i deioniseret vand i en mængde, der er tilstrækkelig til alle replikater af en testkoncentration. Hver opløsning af testkemikaliet blandes grundigt med et parti fugtet jord, før det indføres i testbeholderen.

Vanduopløseligt testkemikalie

20. For kemikalier, der er uopløselige i vand, men opløselige i organiske opløsningsmidler, kan testkemikaliet opløses i den mindst mulige mængde egnede opløsningsmiddel (f.eks. acetone), idet der stadig sikres en korrekt blanding

▼M6

af kemikaliet i jorden og blanding heraf med en del af det nødvendige kvartssand. Der bør kun anvendes flygtige opløsningsmidler. Når der anvendes et organisk opløsningsmiddel, bør alle testkoncentrationer og ekstra negative kontrolprøver med opløsningsmiddel indeholde den samme minimumsmængde opløsningsmiddel. Tilførselsbeholdere bør efterlades udækkede i en vis periode, så det opløsningsmiddel, som er knyttet til tilførsel af testkemikaliet, kan fordampe, så det sikres at det giftige kemikalie ikke spredes i den tid.

Testkemikalie, der er tungtopløseligt i vand og organiske opløsningsmidler

21. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, blandes kvartssand, som skal være en del af den samlede mængde sand, der tilsættes jorden, med mængden af testkemikalie for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt, efter at der er tilsat en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding deles mellem testbeholderne. Proceduren gentages for hver testkoncentration, og der fremstilles også en passende kontrolgruppe.

Påføring af testkemikaliet på jordoverfladen

22. Når testkemikaliet er et pesticid, kan det være hensigtsmæssigt at sprøjte det på jordoverfladen. Jorden behandles, efter at collembolerne er tilsat. Testbeholderne fyldes først med det fugtede jordsubstrat, og dyrene tilsættes. Herefter vejes testbeholderne. For at undgå en direkte eksponering af dyrene for testkemikaliet ved direkte kontakt påføres testkemikaliet mindst en halv time efter indførelsen af collembolerne. Testkemikaliet påføres så jævnt som muligt på jordoverfladen ved hjælp af en egnet laboratoriesprøjteanordning for at simulere sprøjteanvendelse i marken. Påføringen finder sted ved en temperatur inden for en variation på ± 2 °C og for vandige opløsninger, emulsioner eller spredninger ved en vandtilførselshastighed ifølge henstillinger om risikovurdering. Hastigheden kontrolleres ved hjælp af en egnet kalibreringsteknik. Særlige formuleringer som granulat- eller frøblandinger kan påføres på en måde, der er i overensstemmelse med praksis i landbruget. Foder tilsættes efter påsprøjtning.

FREMGANGSMÅDE

Testbetingelser:

23. Den gennemsnitlige testtemperatur skal være 20 ± 1 °C med et temperaturområde på 20 ± 2 °C. Testen udføres under kontrollerede lys-/mørkecyklusser (helst 12 timers lys og 12 timers mørke) med belysning på 400-800 lux i testbeholdernes område.

24. For at kontrollere jordfugtigheden vejes beholderne i begyndelsen, i midten og ved afslutningen af testen. Vægttab på > 2 % erstattes ved tilsætning af deioniseret vand. Det skal bemærkes, at tab af vand kan reduceres ved at opretholde en høj luftfugtighed (> 80 %) i testinkubatoren.

25. pH-værdien måles i begyndelsen og afslutningen af både den forberedende test og den endelige test. Målinger foretages i en ekstra kontrolprøve og en ekstra prøve på de behandlede (alle koncentrationer) jordprøver, der fremstilles og opbevares på samme måde som testkulturerne, men uden tilsætning af collembolerne.

Testprocedure og målinger

26. For hver testkoncentration fyldes en mængde testjord svarende til 30 g våd vægt i testbeholderen. Vandkontroller uden testkemikaliet fremstilles også. Hvis der bruges et bærestof til tilførsel af testkemikaliet, testes en kontrolserie indeholdende bærestoffet alene ud over testserierne. Koncentrationen

▼M6

med opløsnings- eller dispergeringsmiddel skal være den samme som den, der bruges i testbeholderne med testkemikaliet.

27. De enkelte springhaler overføres forsigtigt til hver testbeholder (fordeles tilfældigt i testbeholderne) og placeres på jordoverfladen. For at sikre en effektiv overførsel af dyrene kan der benyttes en lavtsugende luftgennemstrømningsanordning. Antallet af replikater til testkoncentrationer og kontroller afhænger af det anvendte testdesign. Testbeholderne placeres tilfældigt i testinkubatoren, og disse placeringer randomiseres på ny en gang om ugen.

28. Til F. fimetaria-testen bruges 10 hanner og 10 hunner, 23-26 dage gamle, pr. testbeholder. På dag 21 ekstraheres collembolerne fra jorden og tælles. For F. fimetaria skelnes kønnene efter størrelse i det synkroniserede parti dyr, der bruges til testen. Hunner er klart større end hanner (se tillæg 3).

29. Til F. candida-testen bruges der ti 9-12 dage gamle unge individer pr. testbeholder. På dag 28 ekstraheres collembolerne fra jorden og tælles.

30. Som egnet fødekilde tilsættes en tilstrækkelig mængde, f.eks. 2-10 mg kommercielt tilgængeligt granuleret bagetørgær til husholdningsbrug, til hver beholder ved begyndelsen af testen og efter omkring to uger.

31. Ved afslutningen af testen vurderes dødelighed og formering. Efter tre uger (F. fimetaria) eller fire uger (F. candida) ekstraheres collembolerne fra testjorden (se tillæg 4) og tælles (12). En collembol registreres som død, hvis den ikke er til stede i ekstraktionen. Ekstraktions- og tællemetoden valideres. Validiteten omfatter en større ekstraktionseffektivitet for afkom end 95 %, f.eks. ved at tilføre jorden et kendt antal.

32. Praktisk resumé og tidsplan for testmetoden er beskrevet i tillæg 2.

Testdesign

Indledende test til bestemmelse af dosisinterval

33. Når det er nødvendigt, udføres der en indledende test til bestemmelse af dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100, og 1 000 mg/kg jord (tørvægt) og to replikater for hver behandlings- og kontrolprøve. Supplerende information — fra test med lignende kemikalier eller fra litteraturen — om collembolers dødelighed eller formeringsevne kan også være nyttig ved beslutningen af, hvilke koncentrationsområder der skal benyttes i den indledende test til bestemmelse af dosisinterval.

34. Varigheden af den indledende test til bestemmelse af dosisinterval er to uger for F. fimetaria og tre uger for F. candida for at sikre, at der er frembragt et kuld unger. Ved afslutningen af testen vurderes collembolernes dødelighed og formering. Antallet af voksne og forekomsten af afkom registreres.

Endelig test

35. For at bestemme EC_x-værdien (f.eks. EC_{10}, EC_{50}) testes der 12 koncentrationer. Der anbefales mindst to replikater for hver testkoncentrationsbehandling og seks kontrolreplikater. Afstandsfaktoren kan variere alt efter dosis/respons-mønstret.

▼M6

36. For at bestemme NOEC/LOEC skal der testes mindst fem koncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver testkoncentrationsbehandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

37. En kombineret metode giver mulighed for at bestemme både NOEC/LOEC og ECx. Til denne kombinerede metode anvendes der otte behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Der anbefales fire replikater for hver behandling plus otte kontroller. Koncentrationerne bør vælges med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 1,8.

38. Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i testen til fastlæggelse af dosisområdet (dvs. 1 000 mg/kg), kan formeringstesten udføres som en grænsetest under anvendelse af en testkoncentration på 1 000 mg/kg og kontrolprøven. En grænsetest vil give mulighed for at påvise, at der ikke er nogen statistisk signifikant virkning ved grænsekoncentrationen. Der bruges otte replikater til både den behandlede jord og kontrolprøven.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

39. Formeringsevnen er det vigtigste endepunkt (f.eks. antallet af unge individer produceret pr. testbeholder). Den statistiske analyse, f.eks. ANOVA-procedurer, sammenligner behandlinger med Student t-test, Dunnett's test eller Williams' test. Der beregnes 95 %-konfidensintervaller for individuelle middelværdier for behandling.

40. Antallet af overlevende voksne individer i de ubehandlede kontroller er et væsentligt validitetskriterium og skal dokumenteres. Som i testen til fastlæggelse af dosisområdet skal alle andre tegn på skadevirkninger også anføres i den endelige rapport.

LC_x og EC_x

41. EC_x-værdier, herunder deres øvre og nedre 95 % konfidensgrænser for parameteren beregnes efter passende statistiske metoder (f.eks. logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Karber-metoden eller simpel interpolation). En EC_x-værdi opnås ved at indsætte en værdi, der svarer til x % af kontrolgennemsnittet, i den fundne ligning. For at beregne EC_{50} eller enhver anden EC_x underkastes hele datasættet en regressionsanalyse. LC_{50} anslås normalt ved probabilistisk analyse eller lignende analyse, der tager hensyn til de binomialfordelte dødelighedsdata.

NOEC/LOEC

42. Hvis NOEC/LOEC skal bestemmes ved en statistisk analyse, er statistikker pr. beholder (individuelle beholdere anses for replikater) nødvendige. Passende statistiske metoder anvendes i overensstemmelse med OECD Document 54 on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (9). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrolprøverne ved hjælp af en ensidet hypotesetest ved $p \leq 0,05$.

43. Normal fordeling og varianshomogenitet kan testes ved hjælp af en passende statistisk test, f.eks. henholdsvis Shapiro-Wilk-testen og Levene-testen ($p \leq 0,05$). Der kan udføres envejsanalyse af varians (ANOVA) og efterfølgende multiple sammenligningstest. Multiple sammenligninger (f.eks. Dunnett's test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test) kan benyttes

▼M6

til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Document 54 (9)). Ellers kan ikkeparametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstra's trend test) benyttes til at bestemme NOEC og LOEC.

Grænsetest

44. Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrolprøve og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet, homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). T-testen justeret for forskel i varians (Welch t-test) eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.

45. For at bestemme signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrolprøver og kontrolprøver med opløsningsmiddel) kan replikaterne af hver kontrolprøve testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrolprøver og kontrolprøver med opløsningsmiddel samles. Ellers skal alle behandlinger sammenlignes med kontrolprøven med opløsningsmiddel.

Testrapport

46. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— testkemikaliets identitet, parti, batch- og CAS-nummer, renhed

— testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. log Kow, vandopløselighed, damptryk, Henrys konstant (H) og gerne oplysninger om testkemikaliets skæbne i jord), hvis de foreligger

— formuleringen af testkemikaliet og tilsætningsstofferne specificeres, medmindre det rene kemikalie testes

Testorganismer

— identifikation af arter og leverandør af testorganismerne, beskrivelse af opdrætningsbetingelser og testorganismernes aldersgruppe

Testbetingelser:

— beskrivelse af forsøgsdesign og procedure

— oplysninger om fremstilling af testjorden, detaljeret specifikation, hvis der bruges naturlig jord (oprindelse, historie, partikelstørrelsesfordeling, pH, indhold af organisk stof)

— jordens vandholdende evne

— beskrivelse af den teknik, der anvendes til at tilsætte testkemikaliet til jorden

— testbetingelser: lysintensitet, lys-/mørkecyklussernes varighed, temperatur

— en beskrivelse af fodringhyppighed, type og mængde af foder anvendt i testen, fodringsdatoer

— jordens pH-værdi og vandindhold ved påbegyndelse og afslutning af testen (kontrolprøve og hver behandling)

— detaljeret beskrivelse af ekstraktionsmetode og ekstraktionseffektivitet.

▼**M6**

Testresultater

— antal unge individer bestemt i hver testbeholder ved afslutningen af testen

— antal voksne individer og deres dødelighed (%) i hver testbeholder ved afslutningen af testen

— en beskrivelse af synlige fysiologiske eller patologiske symptomer eller tydelige adfærdsændringer

— resultater opnået med referencetestkemikaliet

— NOEC-/LOEC-værdier, LC_x for dødelighed og EC_x for formeringsevne (fortrinsvis LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} og EC_{10}) sammen med 95 % konfidensintervaller. En graf for den tilpassede model, der blev benyttet til beregning, dens funktionsligning og parametre (se (9))

— alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne

— styrken af den konkrete test, hvis der afprøves hypoteser (9)

— afvigelser fra de procedurer, der er beskrevet i denne testmetode, og eventuelt usædvanlige hændelser under testen

— testens validitet

— når NOEC anslås, den mindste påviselige forskel.

LITTERATUR

(1) J.A. Wiles og P.H. Krogh (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (red. H Løkke og C.A.M. Van Gestel), s. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. Den Internationale Standardiseringsorganisation (ISO), Geneve

(3) A. Burges og F. Raw (red.) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) H. Petersen og M. Luxton (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) H. Petersen (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) S.P. Hopkin (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 s. (ISBN 0-19-854084-1)

(7) B. Ulber (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Ph. Lebrun, H.M. André, A. De Medts, Grégoire-Wibo, G. Wauthy (red.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgien), 30. august-2. september 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261-268

(8) Kapitel C.36 i dette bilag, *Rovmide (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) — formeringstest i jord*.

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) J.J. Scott-Fordsmand og P.H. Krogh (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen s. 61 ff. Det danske Miljøministerium.

▼**M6**

(11) P.H. Krogh, 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Miljøstyrelsen, Environmental Project No. 1256, s. 66.

(12) P.H. Krogh, K. Johansen og M. Holmstrup (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) A. Fjellberg (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) C.A. Edwards (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. I Soil Zoology (D.K. Kevan McE., red.). Butterworths, London, s. 412-416

(15) H.E. Goto (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner

Følgende definitioner finder anvendelse for denne testmetode (i denne test udtrykkes alle virksomme koncentrationer som en masse af testkemikalie pr. tør masse testjord):

Kemikalie: et stof eller en blanding.

NOEC (nuleffekt-koncentration, no observed effect concentration): den testkemikaliekoncentration, hvor der ikke observeres nogen virkning. I denne test har den koncentration, der svarer til NOEC, ingen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med kontrolprøven.

LOEC (laveste koncentration med observeret effekt, lowest observed effect concentration): den laveste testkemikaliekoncentration, som ved sammenligning med kontrolprøven har en statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en angiven eksponeringsperiode.

ECx (effektkoncentration for x % virkning): den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrolprøve. EC_{50} er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på et testendepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

De vigtigste trin og tidsplan for udførelse af en collemboltest

De enkelte trin i testen kan opsummeres som følger:

Time (day)	Handling
– 23 til – 26	Fremstilling af synkron F. fimetaria-kultur.
– 14	Fremstil syntetisk jord (blanding af tørre bestanddele). Kontroller den syntetiske jords pH og foretag relevante justeringer. Mål jordens maksimale vandholdende evne.
– 9 til – 12	Fremstilling af synkron F. candida-kultur.
– 2 til – 7	Fugt jorden.
– 1	Fordel unge individer i partier. Fremstil stamopløsninger og tilsæt testkemikalie, hvis der er brug for opløsningsmiddel.
0	Fremstil stamopløsninger, og tilsæt testkemikalie, hvis fast kemikalie, vandopløseligt, eller overfladepåføring er nødvendig. Mål jordens pH, og vej beholderne. Tilsæt foder. Anbring collemboler.
14	Indledende test til bestemmelse af dosisinterval for F. fimetaria: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt). Endelige test: Mål fugtindhold, fyld op med vand, og tilsæt 2-10 mg gær.
21	Endelig F. fimetaria-test: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt). Indledende test til bestemmelse af dosisinterval for F. candida: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt).
28	Endelig F. candida-test: Afslut test, ekstraher dyr, mål jordens pH og tab af vand (vægt).

▼M6

Tillæg 3

Vejledning i opdræt og synkronisering af *F.* fimetaria og F. candida

Tid og varigheder i denne vejledning kontrolleres for hver specifik collembolstamme for at sikre, at tidsangivelserne vil give et tilstrækkeligt antal synkroniserede unge individer. Grundlæggende er det forekomsten af æglægning, efter at de voksne individer er overført til frisk substrat, og udklækning af æg, som afgør, hvilken dag der er den rette til udtagning af æg og udtagning af synkrone unge individer.

Det anbefales at have en fast stamkultur bestående af f.eks. 50 beholdere/petriskåle. Stamkulturen holdes i god foderstand gennem ugentlig fodring, vanding og fjernelse af gammelt foder og kadavere. For få collemboler på substratet kan resultere i inhibering af mere svampevækst. Bruges stamkulturen til ægproduktion for ofte, kan kulturen blive træt. Tegn på træthed er døde voksne individer og mug på substratet. De resterende æg fra produktionen af synkrone dyr kan bruges til at forynge kulturen.

I en synkron F. fimetaria-kultur skelnes hanner fra hunner primært på baggrund af størrelse. Hanner er klart mindre end hunner, og hanners ganghastighed er højere end hunners. En korrekt udvælgelse af køn kræver ikke meget øvelse og kan bekræftes ved mikroskopisk inspektion af det genitale område (13).

1. **Opdræt**

1.a. *Fremstilling af dyrkningssubstrat*

Dyrkningssubstratet er gips (calciumsulfat) med aktiveret kul. Dette giver et fugtigt substrat, idet kullets funktion er at absorbere spildgasser og ekskreter (14) (15). Forskellige former for kul kan bruges til at lette observationerne af collembolerne. F.eks. bruges kulpulver til F. candida og F. fimetaria (som giver en sort/grå gips):

Substratets bestanddele:

— 20 ml aktiveret kul

— 200 ml destilleret vand

— 200 ml gips

eller

— 50 g aktiveret pulveriseret kul

— 260-300 ml destilleret vand

— 400 g gips

Substratblandingen sætter sig før brug.

1.b. *Avl*

Collemboler opbevares i beholdere, f.eks. petriskåle (90 mm × 13 mm), hvor bunden er dækket af et 0,5 m lag gips-/kulsubstrat. De dyrkes ved 20 ± 1 °C ved en lys-/mørkecyklus på 12-12 timer (400-800 Lux). Beholderne holdes fugtige hele tiden, idet det sikres, at den relative luftfugtighed i beholderne er 100 %. Dette kan sikres ved, at der er frit vand i den porøse

▼M6

gips, idet det undgås at skabe en vandfilm på gipsoverfladen. Vandtab kan forebygges ved fugtighed i den omgivende luft. Eventuelle døde individer og eventuel muggen føde fjernes fra beholderne. For at fremme ægproduktionen er det nødvendigt at overføre voksne dyr til petriskåle med nyfremstillet gips-/kulsubstrat.

1.c. *Fødekilde*

Granuleret tørgær til bagning bruges som det eneste foder til både F. candida og F. fimetaria. Frisk foder gives en eller to gange om ugen for at undgå mugdannelse. Det lægges direkte på gipsen i en lille dynge. Massen af den tilsatte bagegær justeres til størrelsen af collembolpopulationen, men som regel er 2-15 mg tilstrækkeligt.

2. **Synkronisering**

Testen udføres med synkroniserede dyr for at opnå homogene forsøgsdyr på samme stadium og i samme størrelse. Endvidere gør synkroniseringen det muligt at skelne F. fimetaria-hanner og -hunner fra 3-ugers alderen og frem baseret på den seksuelle dimorfi, dvs. størrelsesforskelle. Nedenstående procedure er et forslag til, hvordan man kan få synkroniserede dyr (den praktiske fremgangsmåde er valgfri).

2.a. *Synkronisering.*

— Beholderne klargøres med et lag på 0,5 cm gips-/kulsubstrat.

— Til æglægning overføres 150-200 voksne F. fimetaria og 50-100 F. candida fra de bedste 15-20 stamkulturbeholdere med 4-8 uger gammelt substrat til beholderne og fodres med 15 mg bagegær. Det undgås at bringe unge individer sammen med voksne, da tilstedeværelsen af unge kan hæmme ægproduktionen.

— Kulturen holdes på 20 ± 1 °C (gennemsnittet er 20 °C) og en lys-/mørkecyklus på 12-12 timer (400-800 Lux). Det sikres, at der er frisk føde tilgængelig, og at luften er vandmættet. Manglende føde kan føre til, at dyrene lægger afføring på æggene, hvilket resulterer i svampevækst på æggene, eller F. candida kan æde sine egne æg. Efter 10 dage indsamles æggene forsigtigt med en nål og spatel og flyttes over på »æggepapir« (små stykker filterpapir dyppet i gips-/kulvælling), som anbringes i en beholder med frisk gips-/kulsubstrat. Nogle få gærpartikler tilsættes til substratet for at tiltrække unge individer og få dem til at forlade æggepapiret. Det er vigtigt, at æggepapiret og substratet er fugtigt, ellers vil æggene dehydrere. Som alternativ kan voksne dyr fjernes fra dyrkningsboksene til synkronisering, når de har produceret æg i 2-3 dage.

— Efter tre dage vil de fleste af æggene på æggepapiret være udklækket, og nogle unge individer kan findes under æggepapiret.

— For at få unge i samme alder fjernes æggepapiret med uklækkede æg fra petriskålen med en tang. De unge individer, som nu er 0-3 dage, bliver i skålen og fodres med bagegær. Uklækkede æg bortskaffes.

— Æg og udklækkede unge dyrkes på samme måde som voksne individer. Især for F. fimetaria træffes følgende foranstaltninger: der sikres tilstrækkelig frisk foder, gammelt muggent foder fjernes, efter en uge deles de unge individer i nye petriskåle, forudsat at tætheden er over 200.

▼**M6**

2.b. *Håndtering af collemboler ved testens begyndelse*

— 9-12 dage gamle F. candida eller de 23-26 dage gamle F. fimetaria indsamles, f.eks. ved sug og frigives i en lille beholder med fugtigt gips-/kulsubstrat, og deres fysiske tilstand kontrolleres under binokulært mikroskop (sårede og skadede dyr kasseres). Alle trin gennemføres, mens collembolerne holdes i en fugtig atmosfære for at undgå stress på grund af vandmangel, f.eks. ved hjælp af våde overflader osv.

— Beholderen vendes med bunden i vejret, og der bankes på den, så collembolerne overføres til jorden. Statisk elektricitet neutraliseres, ellers kan dyrene flyve op i luften eller klæbe til siden af testbeholderen og tørre ud. En ionisator eller et fugtigt klæde under beholderen kan anvendes til neutralisering.

— Foderet spredes over hele jordoverfladen og ikke bare i en dynge.

— Under transport og i testperioden undgås det at banke på testbeholderne eller på anden vis fysisk forstyrre dem, da dette kan øge jordens komprimering og hæmme samspillet mellem collembolerne.

3. **Alternative collembolarter**

Andre collembolarter kan vælges til testning ifølge denne testmetode, f.eks. Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. En række forudsætninger skal opfyldes på forhånd, før der anvendes alternative arter:

— de er entydigt identificeret

— der angives en begrundelse for valg af art

— det sikres, at reproduktionsbiologien er inkluderet i testfasen, så det bliver et potentielt mål under eksponeringen

— livshistorien er kendt: alder ved kønsmodning, ægudviklingens varighed og stadier, der skal eksponeres

— testsubstratet og fødeforsyningen skal give optimale betingelser for vækst og reproduktion

— variationen skal være tilstrækkeligt lav til en præcis og nøjagtig toksicitetsberegning.

▼M6

Tillæg 4

Ekstraktion og tælling af dyr

1. **Der kan anvendes to ekstraktionsmetoder**

1.a. Første metode: Der kan anvendes en ekstraktor med kontrolleret temperaturgradient baseret på MacFadyens principper (1). Varmen kommer fra et varmeelement øverst i ekstraktionsboksen (reguleret gennem en termistor placeret på jordprøvens overflade). Temperaturen i den afkølede væske omkring opsamlingsbeholderen reguleres gennem en termistor placeret på opsamlingsboksens overflade (anbragt under jordkernen). Termistorerne er forbundet til en programmerbar kontrolenhed, som øger temperaturen efter en forprogrammeret plan. Dyr indsamles i den afkølede opsamlingsboks (2 °C) med et lag af gips/kul i bunden. Ekstraktionen påbegyndes ved 25 °C, og temperaturen øges automatisk hver 12. time med 5 °C, og varer i alt 48 timer. Efter 12 t. ved 40 °C er ekstraktionen slut.

1.b. Anden metode: Efter den eksperimentelle inkubationsperiode vurderes antallet af unge collemboler ved hjælp af flotation. Til det formål udføres testen i beholdere på ca. 250 ml. Ved afslutning af testen tilsættes ca. 200 ml destilleret vand. Jorden omrøres forsigtigt med en fin pensel, så collembolerne kan flyde til vandoverfladen. En lille smule — ca. 0,5 ml — sort Kentmere fotofarve kan tilsættes til vandet, så kontrasten mellem vandet og de hvide collemboler bliver større, og det bliver nemmere at tælle dem. Farven er ikke giftig for collemboler.

2. **Tælling:**

Tælling af antal kan foretages med det blotte øje eller under et lysmikroskop ved hjælp af et gitter, der placeres over flotationsbeholderen eller ved at fotografere overfladen af hver beholder og senere tælle collembolerne på forstørrede tryk eller projicerede slides. Optællingerne kan også foretages ved hjælp af digitale billedbehandlingsteknikker (12). Alle teknikker valideres.

▼M6

Tillæg 5

Bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne

Følgende metode til bestemmelse af jordens maksimale vandholdende evne (WHC) har vist sig at være hensigtsmæssig. Den beskrives i bilag C til ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Del 2: Determination of effects on reproduction).

Der opsamles en bestemt mængde (f.eks. 5 g) testjordsubstrat ved hjælp af en egnet prøvetagningsanordning (sneglebor osv.). Bunden af røret dækkes med et stykke vådt filtrerpapir, og røret placeres herefter på et stativ i et vandbad. Røret sænkes gradvist, indtil vandstanden står over jordhøjde. Det står herefter i vandet i omkring tre timer. Da ikke alt vand, som absorberes af jordens kapillærer, kan bindes, drænes jordprøven i to timer ved at anbringe røret på et leje af meget vådt fintmalet kvartssand i en overdækket beholder (for at forhindre udtørring). Prøven vejes herefter tørret til en konstant masse ved 105 °C. Den vandholdende evne (WHC) beregnes som følger:

$$\text{WHC (i \% af tørmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Hvor:

S = vandmættet substrat + rørmasse + filtrerpapirmasse

T = tara (rørmasse + filtrerpapirmasse)

D = tørmasse af substrat

▼**M6**

Tillæg 6

Bestemmelse af jordens pH

Følgende metode til bestemmelse af en jords pH er baseret på beskrivelsen i ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH.

En bestemt mængde jord tørres ved stuetemperatur i mindst 12 t. En suspension af jorden (indeholdende mindst 5 gram jord) fremstilles herefter i fem gange sin mængde af enten en 1 M opløsning kaliumchlorid (KCl), analysekvalitet, eller af en 0,01 M opløsning calciumchlorid ($CaCl_2$), analysekvalitet. Suspensionen rystes grundigt i fem minutter og henstår herefter til bundfældning i mindst to timer, men højst 24 timer. Væskefasens pH måles ved hjælp af et pH-meter, der er kalibreret før hver måling i en passende række bufferopløsninger (f.eks. pH 4,0 og 7,0).

▼M6

C.40. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER OVER EN HEL LIVSCYKLUS MED FORURENET VAND ELLER FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 233 (2010). Den har til formål at vurdere virkningerne på den tovingede ferskvands-Chironomus sp. af livslang eksponering for kemikalier med fuld dækning af den første generation (P-generationen) og den tidlige del af anden generation (F1-generationen). Det er en udvidelse af de eksisterende testmetoder C.28 (1) eller C.27 (15), der anvender et eksponeringsscenarie med henholdsvis forurenet vand eller forurenet sediment. Den tager hensyn til eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus dilutus (tidligere benævnt C. tentans (2)), som blev udarbejdet i Europa og Nordamerika (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) og efterfølgende ringtestet (1) (7) (10) (11) (12). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (13) (14). Hele eksponeringsvarigheden er 44 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og ca. 100 dage for C. dilutus.

2. Både vand- og sedimenteksponeringsscenarierne beskrives i denne testmetode. Valget af et velegnet eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Vandeksponeringsscenariet, hvor vandsøjlen spikes, har til formål at simulere et tilfælde af aerosolspredning af pesticider og dækker den første topkoncentration i overfladevand. Spiking af vand kan også bruges til andre typer af eksponering (herunder kemikalieudslip), men ikke til akkumuleringsprocesser i sedimentet, der varer længere end testperioden. I så fald — og også når afstrømning er pesticidernes vigtigste tilførselsvej til vandområder — kan et forurenet sedimentdesign være mere hensigtsmæssigt. Hvis andre eksponeringsscenarier er af interesse, kan testdesignet let tilpasses. Hvis fordelingen af testkemikalie mellem vandfasen og sedimentlaget f.eks. ikke er af interesse, og adsorption til sedimentet skal minimeres, kan det overvejes at anvende et syntetisk sediment som erstatning (f.eks. kvartssand).

3. Kemikalier, der kræver test af levende organismer, som lever i sediment, kan persistere i sediment over lange perioder. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres på forskellige måder. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, det tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af kemikaliets fysisk-kemiske egenskaber. Ved stærkt adsorberende kemikalier eller ved kemikalier, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile kemikalier kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af testkemikaliet (se punkt 31). Derfor er det muligt at inkludere alle eksponeringsveje og alle livsstadier.

4. Målte endepunkter er det samlede antal udviklede voksne (for både første og anden generation), udviklingshastighed (for både første og anden generation), kønsfordeling mellem fuldt udviklede og levende voksne (for både første og anden generation), antal æggesnore pr. hun (kun første generation) og æggesnorenes fertilitet (kun første generation).

5. Formuleret sediment anbefales stærkt. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:

▼M6

— udsving i testene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikkekontaminerede og rene sedimentkilder

— test kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna

— færre omkostninger sammenlignet med udtagning på stedet af de tilstrækkelige mængder, som er nødvendige til rutinetest

— formuleret sediment giver mulighed for toksicitetssammenligninger på tværs af undersøgelser og rangordning af kemikalier i overensstemmelse hermed (3).

6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af testkemikaliet i sediment/vandsystemet. Testen begynder med, at æglarver (første generation) anbringes i testbægerglas med forurenet sediment, alternativt er testkemikaliet tilsat vandet efter tilsætning af larverne. Chironomidudvikling, udviklingstid og kønsfordeling af de fuldt udviklede og levende individer vurderes. Udviklede voksne overføres til avlsbure for at fremme sværmning, parring og æglægning. Antallet af producerede æggesnore og deres fertilitet vurderes. Af disse æggesnore fås æglarver af anden generation. Disse larver placeres i frisk fremstillede testbægerglas (spiking-procedure som for første generation) for at bestemme anden generations levedygtighed ved at vurdere deres udvikling, udviklingstid og kønsfordeling af de fuldt udviklede og levende individer (en skematisk fremstilling af livscyklustesten kan ses i tillæg 5). Alle data analyseres enten efter en regressionsmodel for at anslå, hvilken koncentration der ville forårsage X % reduktion i det relevante endepunkt, eller ved at bruge hypotesetest for at bestemme en nuleffekt-koncentration (NOEC). Sidstnævnte kræver en sammenligning af behandlingsrespons med de relevante kontrolresponser ved hjælp af statistiske test. I tilfælde af hurtigt nedbrydelige kemikalier bemærkes det i scenariet med forurenet vand, at de senere livsstadier af hver generation (f.eks. puppefasen) kan blive eksponeret for et betydeligt lavere koncentrationsniveau i det overliggende vand end æglarverne. Hvis det er et problem, og der er brug for et sammenligneligt eksponeringsniveau for hvert livsstadium, kan følgende ændringer i testmetoden overvejes:

— parallelle test med spiking på forskellige livsstadier eller

— gentagen spiking (eller udskifting af overliggende vand) af testsystemet i begge testfaser (første og anden generation), hvorved spiking- (udskiftnings-)intervallerne justeres til testkemikaliets skæbne.

Sådanne ændringer kan kun lade sig gøre i scenariet med forurenet vand, men ikke i scenariet med forurenet sediment.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Testkemikaliets vandopløselighed, damptryk og log K_{ow}, målt eller beregnet fordeling i sediment og stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og

▼M6

publiceret nøjagtighed og detektionsgrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter testkemikaliets strukturformel og renhed. Testkemikaliets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttig. For kemikalier, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (16).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at laboratoriepopulationens følsomhed ikke har ændret sig. Som med dafnier vil det være tilstrækkeligt at udføre en 48-timers akuttest (efter 17). Indtil der foreligger en valideret akut retningslinje, kan der overvejes en kronisk test ifølge kapitel C.28 i dette bilag. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13). (1) (3) (6) (7) (18).

TESTENS GYLDIGHED

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— gennemsnitsudviklingen i kontrolbehandlingen bør være mindst 70 % ved afslutningen af eksponeringsperioden for begge generationer (1) (7)

— for C. riparius og C. yoshimatsui *bør 85 % af det samlede antal udviklede voksne individer fra kontrolbehandlingen i begge generationer fremkomme mellem 12 og 23 dage efter anbringelsen af æglarverne i beholderne. For* C. dilutus er en periode på 20-65 dage acceptabel

— den gennemsnitlige kønsfordeling af fuldt udviklede og levende voksne (som andel hunner eller hanner) i kontrolbehandlingen af begge generationer bør være mindst 0,4, men højst 0,6

— for hvert avlsbur bør antallet af æggesnore i kontrollerne af første generation være mindst 0,6 pr. hun, der indsættes i avlsburet

— andelen af fertile æggesnore i hvert avlsbur for kontrolgrupperne af første generation bør være mindst 0,6

— ved afslutningen af eksponeringsperioden for begge generationer måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hver beholder. Iltkoncentrationen bør være mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV ([1])), og pH-værdien for det overliggende vand bør være mellem 6 og 9 i alle testbeholdere

— vandtemperaturen må højst variere med ± 1,0 °C.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testbeholdere og avlsbure

11. Larverne eksponeres i 600 ml glasbægre, der måler 8,5 cm i diameter (se tillæg 5). Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2-3 cm^2 pr. larve). Forholdet mellem sedimentlagets dybde og dybden af det overliggende vand bør være ca. 1:4.

([1]) Ved 20 °C og under atmosfærisk standardtryk er ASV i ferskvand lig med 9,1 mg/l (60 % svarer til 5,46 mg/l).

▼M6

Der bruges avlsbure (minimum 30 cm i alle tre dimensioner) med gaze (maskestørrelse ca. 1 mm) øverst og på mindst den ene side af buret (se tillæg 5). I hvert bur anbringes en 2 l krystallisationsskål med testvand og sediment til æglægning. Også for krystallisationsskålen skal forholdet mellem sedimentlagets dybde og dybden af det overliggende vand være ca. 1:4. Efter at æggesnorene er indsamlet fra krystallisationsskålen, anbringes de på en mikrotiterplade med 12 brønde (en snor pr. brønd indeholdende mindst 2,5 ml vand fra den spikede krystallisationsskål), hvorefter pladerne dækkes med et låg for at forhindre væsentlig fordampning. Andre beholdere, som er egnede til opbevaring af æggesnore, kan også anvendes. Med undtagelse af mikrotiterpladerne bør alle testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testsystemet, være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. polytetrafluorethylen).

Valg af art

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis Chironomus riparius. C. yoshimatsui kan også benyttes. C. dilutus er også egnet, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Nærmere oplysninger om dyrkningsmetoder er anført i tillæg 2 for C. riparius. Information om dyrkningsbetingelser er også tilgængelig for C. dilutus (5) and C. yoshimatsui (14). Identifikation af arterne bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismerne kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomidelarverne. Det anbefales også, at sedimenter før testen behandles i syv dage under testbetingelser. Følgende formulerede sediment, jf. (1), anbefales (1) (20) (21):

a. 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5-6,0 som muligt. Det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret

b. 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

c. 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50-200 μm)

d. deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %

e. kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5

f. det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i a) og c).

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser og organiske phosphorforbindelser).

▼M6

Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som $CaCO_3$. Hvis der imidlertid er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og testkemikaliet, anvendes vand med en lavere hårdhedsgrad (og dermed må Elendt Medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand anvendes i hele testen. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenet vand

16. a. Testkoncentrationer beregnes på grundlag af vandsøjlekoncentrationer, dvs. vandet over sedimentet. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger fremstilles fortrinsvis ved at opløse testkemikaliet i testvandet. Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Som opløsningsmiddel kan der benyttes acetone, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Koncentrationen af opløselighedsfremmere i det færdige testmedium skal være så lille som muligt (dvs. $\leq$ 0,1 ml/l) og bør være den samme i alle behandlingsprøver. Når der benyttes opløselighedsfremmere, må dette ikke have nogen væsentlig virkning på overlevelsen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest med opløsningsmiddel sammenlignet med en negativ (vand)kontrol. Det undgås så vidt muligt at bruge sådanne materialer.

Stamopløsninger — forurenet sediment

16. b. Forurenet sediment af den valgte koncentration fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af testkemikaliet tilsættes sedimentet direkte. En stamopløsning af testkemikaliet opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis testkemikaliet er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter

▼M6

med 10 g fint kvartssand til hvert testglas. Vent, indtil opløsningsmidlet er fordampet, og fjern det helt fra sandet. Sandet blandes herefter med en passende mængde sediment. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere testkemikaliet. Det sand, der findes i testkemikaliet og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment skal således fremstilles med mindre sand). Det sikres, at det testkemikalie, der tilsættes sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bestemme homogeniteten.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau, antal larver pr. testglas, antal krystallisationsskåle og avlsbure. Design for EC_x, NOEC og en grænsetest er beskrevet nedenfor.

Design til regressionsanalyse

18. Effektkoncentrationen (EC_x) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning, skal være omfattet af testen, således at endepunktet ikke ekstrapoleres uden for rammerne for de genererede data. Ekstrapolering meget under den laveste eller over den højeste koncentration bør undgås. En indledende test til bestemmelse af dosis-interval ifølge testmetode C.27 eller C.28 kan være nyttig med henblik på at vælge et passende testkoncentrationsområde.

19. Til en EC_x-metode kræves der mindst fem koncentrationer og otte replikater til hver koncentration. Til hver koncentration bruges to avlsbure (A og B). De otte replikater inddeles i to grupper à fire replikater til hvert avlsbur. Denne sammensmeltning af replikater er nødvendig på grund af det antal individer, der er nødvendig i buret for at sikre forsvarlige reproduktionsvurderinger. Den anden generation har dog otte replikater igen, som indledes på grundlag af de eksponerede populationer i avlsburene. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosis/respons-kurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres til seks (tre for hvert avlsbur), hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for EC_X.

Design til beregning af NOEC

20. Til en NOEC-metode bruges fem testkoncentrationer med mindst otte replikater (fire for hvert avlsbur A og B), og faktoren mellem koncentrationerne må ikke være større end to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($\alpha = 0{,}05$). Til udviklingshastighed, befrugtningsevne og fertilitet er en variansanalyse (ANOVA) normalt passende efterfulgt af Dunnetts test eller Williams' test (22-25). Til emergensforhold og kønsfordeling kan Cochran-Armitage, Fishers eksakte test med Bonferroni-korrektion eller Mantel-Haenszels test være egnede.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (en testkoncentration og kontrol(ler)), hvis der ikke observeres nogen virkninger i den valgfrie indledende test til fastlæggelse af koncentrationsområde op til en maksimumskoncentration. Formålet med grænsetesten er at vise, at eventuelle toksiske virkninger af testkemikaliet findes ved større niveauer end den testede grænsekoncentration. For vand foreslås 100 mg/l og for sediment 1 000 mg/kg (tørvægt). Normalt er mindst otte replikater for både behandlings- og kontrolgruppen nødvendige. Der skal påvises statistisk styrke til at detektere en

▼M6

forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (α = 0,05). Med hensyn til metrisk respons (f.eks. udviklingshastighed) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). En T-test justeret for forskel i varians eller en ikkeparametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whitney-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Klargøring af vand- og sedimentsystemet (spiking af vand)

22. a. Formuleret sediment (se punkt 13-14 og tillæg 3) tilsættes hver testbeholder og krystallisationsskål, så det danner et lag på mindst 1,5 cm (for krystallisationsskålen kan det være noget lavere), men højst 3 cm. Vand (se punkt 15) tilsættes, så forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af vandet ikke overstiger 1:4. Efter klargøring af testbeholderne hensættes sediment-vandsystemet til forsigtig beluftning i ca. syv dage, inden æglarverne af første og anden generation tilsættes (se punkt 14 og tillæg 3). Sediment-vandsystemet i krystallisationsskålene beluftes ikke under testen, da de ikke skal sikre larvernes overlevelse (æggesnorene indsamles allerede før udklækning). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes herefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

Klargøring af vand- og sedimentsystemet (forurenet sediment)

22. b. Forurenede sedimenter klargjort i overensstemmelse med punkt 16, b), anbringes i beholdere og krystallisationsskål, og overliggende vand tilsættes til et forhold mellem sediment- og vandvolumen på 1:4. Dybden af sedimentlaget skal ligge inden for området 1,5-3 cm (det kan være noget lavere for krystallisationsskålen). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger. Når det forurenede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at testkemikaliet fordeler sig fra sediment til den vandige fase (4) (5) (7) (18). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde op til fem uger. Da mange kemikalier i dette tidsrum ville blive nedbrudt, afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer anbefales. Når det vides, at kemikaliets nedbrydningshalveringstid i sedimentet er lang (se punkt 8), kan ækvilibreringstiden forlænges. Efter denne yderligere ækvilibreringstid måles koncentrationen af testkemikaliet i det overliggende vand, porevandet og sedimentet som minimum ved den højeste koncentration og en lavere (se punkt 38). Disse analytiske bestemmelser af testkemikaliet gør det muligt at beregne en massebalance og angive resultater baseret på målte koncentrationer.

23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). Under testen kan vandmængden om nødvendigt suppleres op til det oprindelige volumen for at kompensere for fordampning. Dette gøres med destilleret eller deioniseret vand for at forhindre saltophobning. Krystallisationsskåle i

▼M6

avlsburene dækkes ikke og kan, men behøver ikke, tilpasses for at kompensere for vandtab i testperioden, eftersom æggesnorene kun er i kontakt med vandet i omkring en dag, og skålene kun bruges i en kort fase af testen.

Tilsætning af testorganismer

24. 4-5 dage før tilsætningen af æglarver af første generation udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Under alle omstændigheder kan en lille mængde foder, f.eks. et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager tilsættes dyrkningsmediet (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for Chironomus riparius ved 20 °C og 1-4 dage for Chironomus dilutus ved 23 °C og Chironomus yoshimatsui ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Æglarver (højst 48 timer efter udklækning) anvendes i testen. Larver i første stadium kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (7).

25. Æglarver fordeles tilfældigt, så der er 20 i hvert testglas med sediment/vandsystemet, ved hjælp af en stump pipette. Beluftning af vandet standses, mens larverne tilsættes til testglassene og i 24 timer derefter (se punkt 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se punkt 19-20) anvendes der mindst 120 larver pr. koncentration (6 replikater pr. koncentration) i forbindelse med bestemmelse af EC_X-tilgangen og 160 i forbindelse med NOEC-tilgangen (8 replikater pr. koncentration). Ved designet med forurenet sediment begynder eksponeringen med tilsætning af larverne.

Spiking af det overliggende vand

26. 24 timer efter tilsætning af æglarverne af første generation tilsættes testkemikaliet i den overliggende vandsøjle, og let beluftning tilføres igen (se punkt 7 for eventuelle ændringer af testdesign). Små mængder stamopløsninger af testkemikaliet tilsættes under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. I designet med forurenet vand begynder eksponeringen med spiking af vandet (dvs. en dag efter tilsætning af larverne).

Udtagning af udviklede voksne

27. Udviklede individer af første generation udtages mindst en gang, men helst to gange om dagen (se punkt 36) fra testglassene ved hjælp af et sugeapparat eller lignende (se tillæg 5). Det er vigtigt at undgå at skade de voksne individer. De udtagne individer fra fire testglas i en behandling udsættes i et avlsbur, som de tidligere var blevet udvalgt til. På dagen for første emergens (hanner) tilsættes krystallisationsskålene en lille mængde stamopløsning af testkemikaliet ved pipettering under vandoverfladen (design med forurenet vand). Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. Koncentrationen af testkemikaliet i krystallisationsskålen er nominelt den samme som i de

▼M6

behandlingsglas, der er valgt til det specifikke avlsbur. Til designet med forurenet sediment klargøres krystallisationsskålene omkring dag 11 efter påbegyndelse af eksponeringen (dvs. tilsætning af larverne af første generation), så de kan ækvilibrere i omkring 48 timer, før de første æggesnore produceres.

28. Æggesnore indsamles fra krystallisationsskålen i avlsburet ved hjælp af pincetter eller en stump pipette. Hver æggesnor anbringes i et glas med dyrkningsmedium fra den krystallisationsskål, den blev indsamlet fra (f.eks. en brønd på en mikroplade med 12 brønde sammen med mindst 2,5 ml medium). Glassene med æggesnore dækkes med et låg for at forhindre væsentlig fordampning. Æggesnorene opbevares til observation i mindst seks dage efter at de er blevet produceret, således at de kan klassificeres som frugtbare eller ufrugtbare.

Til at starte den anden generation udvælges mindst tre, men fortrinsvis seks fertile æggesnore fra hvert avlsbur sammen med noget føde og henstilles til udklækning. Disse æggesnore skulle være produceret, når æglægningen er på sit højeste, hvilket normalt sker omkring testdag 19 i kontrollerne. Ideelt set påbegyndes anden generation af alle behandlinger den samme dag, men på grund af kemikaliets virkninger på larvernes udvikling er dette måske ikke altid muligt. I så fald kan de højere koncentrationer påbegyndes senere end de lavere behandlinger og kontrollen (med opløsningsmiddel).

29. a. I designet med forurenet vand klargøres sediment/vandsystemet til den anden generation ved at tilsætte testkemikaliet til den overliggende vandsøjle, ca. en time før æglarverne tilsættes i testglassene. Små mængder testkemikalieopløsninger tilsættes nu under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet. Efter spiking tilføres let beluftning.

29. b. I designet med forurenet sediment klargøres eksponeringsglassene med sediment/vandsystemet til den anden generation på samme måde som til første generation.

30. 20 æglarver (højst 48 timer efter udklækning) af anden generation fordeles tilfældigt til hvert testglas med det forurenede sediment/vandsystem ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet standses, mens æglarverne tilsættes til testglassene og i 24 timer efter tilsætningen af larverne. Afhængigt af det anvendte testdesign (se punkt 19-20) anvendes der mindst 120 larver pr. koncentration (6 replikater pr. koncentration) i forbindelse med bestemmelse af EC_X-tilgangen og 160 i forbindelse med NOEC-tilgangen (8 replikater pr. koncentration).

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for C. yoshimatsui) pr. larve pr. dag er tilstrækkeligt til unge larver i de første 10 dage af deres udvikling. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1,0 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen reduceres i alle behandlings- og kontrolprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis dødelighed observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen.

Den toksikologiske relevans af eksponering via indtagelse er generelt højere i kemikalier med en høj affinitet for organisk kulstof eller kemikalier, der kovalent bindes til sedimentet. Ved test af kemikalier med disse egenskaber skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre larvernes

▼M6

overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes til det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden afhængigt af myndighedernes krav. For at forhindre forværring af vandkvaliteten anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (Urtica dioica), morbærtræ (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens) eller spinat (Spinacia oleracea). Andet plantemateriale (Cerophyl eller α-cellulose) kan også anvendes. Tilsætning af en fuld ration af en organisk foderkilde til sedimentet før spiking er ikke uvæsentlig for vandkvaliteten og den biologiske ydeevne (21), heller ikke en standardiseret metode, men nye undersøgelser tyder på, at denne metode fungerer (19) (26). Voksne individer i buret har normalt ikke brug for at blive fodret, men befrugtningsevne og fertilitet styrkes, når et stykke vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, gives som foder til udviklede voksne (34).

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages 24 timer efter tilsætningen af æglarver af begge generationer og fortsættes gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-pipette af glas, hvis udløb er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget og giver nogle få bobler pr. sekund. Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet, samtidig med at validitetskriteriet om minimum 60 % ASV (punkt 10) opfyldes. Nærmere detaljer findes i (16).

33. Testen med C. riparius udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For C. dilutus og C. yoshimatsui anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten bør være 500-1 000 lux. Til avlsburene kan der inkluderes en ekstra times morgen- og aftenfase.

Eksponeringsvarighed

34. Design med forurenet vand: Eksponeringsperioden for den første generation begynder, når testkemikaliet tilsættes til det overliggende vand i testglassene (som er en dag efter ilægning af larverne — med henblik på eventuelle ændringer af eksponeringsdesignet, se punkt 7). Eksponering af den anden generation af larver begynder straks, eftersom de lægges i et sediment/vandsystem, der allerede er blevet forurenet. Den maksimale eksponeringsvarighed for første generation er 27 dage og for anden generation 28 dage (første generations larver tilbringer en dag i glassene uden eksponering) for så vidt angår C. riparius og C. yoshimatsui. I betragtning af overlapningen varer hele testen ca. 44 dage. For C. dilutus er den maksimale eksponeringsvarighed henholdsvis 64 og 65 dage for første og anden generation. Den samlede varighed er ca. 100 dage.

Design med forurenet sediment: eksponeringen begynder med tilsætningen af larver og varer højst 28 dage for begge generationer for C. riparius og C. yoshimatsui og højst 65 dage for begge generationer for C. dilutus.

Observationer

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede og levende han- og hunindivider bestemmes for begge generationer. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner og tynde krop.

▼M6

36. Testglassene for begge generationer observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere eventuel abnorm adfærd hos larverne (om individer f.eks. forlader sedimentet eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af emergensperioden, som starter omkring 12 dage efter tilsætning af larverne for C. riparius og C. yoshimatsui (efter 20 dage for C. dilutus), foretages en tælling og kønsbestemmelse af de udviklede individer mindst en gang, men helst to gange om dagen (tidligt om morgenen og sent om eftermiddagen). Efter identifikation fjernes individerne af første generation forsigtigt fra beholderne og overføres til avlsburet. Individer af anden generation fjernes og aflives efter identifikation. Eventuelle æggesnore i testglassene fra første generation indsamles individuelt og overføres med mindst 2,5 ml frisk vand til mikroplader med 12 brønde (eller andre egnede beholdere), som dækkes med et låg for at hindre væsentlig fordampning. Antallet af døde larver og synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Eksempler på avlsbur, testglas og exhauster kan ses i tillæg 5.

Reproduktion

37. Virkninger på reproduktion vurderes via antallet af æggesnore produceret af den første generation af individer og disse æggesnores fertilitet. En gang om dagen indsamles æggesnorene fra krystallisationsskålen, der står i hver avlsbeholder. Æggesnore indsamles og overføres med mindst 2,5 ml frisk vand til en mikroplade med 12 brønde (en æggesnor i hver brønd) eller andre egnede beholdere, som dækkes med et låg for at hindre væsentlig fordampning. Følgende kendetegn dokumenteres for hver æggesnor: produktionsdag, størrelse (normal, dvs. 1,0 ± 0,3 cm eller lille, typisk ≤ 0,5 cm) og struktur (normal = bananform med snoet æggestreng eller abnorm, f.eks. ikkesnoet æggestreng) og fertilitet (fertil eller infertil). I løbet af seks dage efter at æggesnoren er produceret, vurderes dens fertilitet. En æggesnor anses for fertil, når mindst en tredjedel af æggene udklækkes. Det samlede antal hunner, der tilføres avlsburet, bruges til at beregne antallet af æggesnore pr. hun og antallet af fertile æggesnore pr. hun. Om nødvendigt kan antallet af æg i en æggesnor anslås ikkedestruktivt ved hjælp af ringtællemetoden (beskrevet i 32 og 33).

Analysemålinger

Testkemikaliets koncentration

38. Som minimum analyseres prøver af det overliggende vand, porevandet og sedimentet ved eksponeringens begyndelse (helst en time efter tilsætning af testkemikaliet ved spiking af vand) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Dette gælder glas fra begge generationer. Fra krystallisationsskålene i avlsburet analyseres kun det overliggende vand, eftersom det er det, æggesnorene kommer i kontakt med (for det forurenede sedimentdesign kan en analytisk bekræftelse af sedimentkoncentrationen overvejes). Der kan foretages yderligere målinger af sediment, porevand eller overliggende vand under testen, hvis det anses for nødvendigt. Disse bestemmelser af testkemikaliekoncentrationen giver oplysninger om testkemikaliets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet. Prøvetagning af sediment- og porevand ved testens begyndelse og under testen (se punkt 39) kræver supplerende testglas for at foretage analytiske bestemmelser. Målinger i sediment i designet med forurenet vand er måske ikke nødvendige, hvis fordelingen af testkemikaliet

▼M6

mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i en vand- og sedimenttest under lignende betingelser (f.eks. forholdet mellem vand og sediment, anvendelsestype og organisk kulstofindhold i sediment), eller hvis det viser sig, at målte koncentrationer i det overliggende vand forbliver inden for 80-120 % af de nominelle eller målte startkoncentrationer.

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7 og/eller 14), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt (pore-) vand. Hvis det påvises, at testkemikaliet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen kan være for lille.

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur samt opløst ilt i vandet og krystallisationsskålene måles på en hensigtsmæssig måde (se punkt 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og i et testglas og krystallisationsskålen ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne livscyklustest er at bestemme testkemikaliets virkning på reproduktionen og, for to generationer, udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede og levende han- og hunindivider. For emergensforholdet samles data for hanner og hunner. Hvis der ikke er statistisk signifikante forskelle mellem følsomhed i udviklingshastigheden for de to køn, kan resultater for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse.

43. Effektkoncentrationer udtrykt som koncentrationer i det overliggende vand (for forurenet vand) eller i sedimentet (for forurenet sediment) beregnes normalt ud fra målte koncentrationer ved begyndelsen af eksponeringen (se punkt 38). For forurenet vand beregnes gennemsnittet derfor for hver behandling, idet koncentrationerne typisk måles ved begyndelsen af eksponeringen i det overliggende vand i glassene for begge generationer og i krystallisationsskålene. For forurenet sediment beregnes gennemsnittet for hver behandling, idet koncentrationerne typisk måles ved begyndelsen af eksponeringen i glassene for begge generationer (det er valgfrit at måle koncentrationerne i krystallisationsskålene).

44. For at beregne et punktestimat, dvs. en EC_x-værdi, bruges data pr. glas og pr. avlsbur som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at der kan ses bort fra den. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi (31).

▼**M6**

45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af ANOVA-metoderne (f.eks. Williams' og Dunnetts testprocedurer). Williams' test vil være egnet, når en monoton dosisrespons teoretisk set forventes, og Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Alternativt kan mere robuste test (27) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes (31).

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor en monoton dosisrespons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indicerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (27).

Summen af levende individer (hanner og hunner) udviklet pr. glas, n_e bestemmes og deles med antallet af tilførte larver, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede levende individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas (normalt 20)

Når n_e er større end n_a (dvs. når der utilsigtet blev tilført mere end det fastsatte antal larver), skal n_a svare til n_e.

47. En alternativ fremgangsmåde, som egner sig bedst til store prøvestørrelser, når der er ekstra binominal varians, er at behandle emergensforholdet som en kontinuerlig respons og følge procedurer i overensstemmelse med disse ER-data. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).

48. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdierne først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Tukey-Freeman-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis der anvendes absolutte hyppigheder. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($\sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.

49. For emergensforhold beregnes EC_x-værdier ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. probit-, logit- eller Weibull-modeller (28)). Hvis regressionsanalysen mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), kan der anvendes andre ikkeparametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

50. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af individer (ved beregning af den sande udviklingstid tages

▼M6

larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning). Udviklingshastigheden (enhed: 1/dag) er det reciprokke tal til udviklingstiden og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetstest, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på en normalfordeling end udviklingstiden. Testfremgangsmåder baseret på mere anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som en kontinuerlig respons kan EC_x-værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (29) (30)). En NOEC for den gennemsnitlige udviklingshastighed kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test. Da hanner udvikles tidligere end hunner, dvs. har en højere udviklingshastighed, er det nyttigt at beregne udviklingshastigheden for hvert køn for sig ud over den for det samlede antal individer.

51. I forbindelse med statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag x og x – l (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas ($\bar{x}$) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i: indeks for inspektionsinterval

m: maksimalt antal inspektionsintervaller

f_i: antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

n_e: det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af testen (Σf_i)

x_i: udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = 1/\text{dag}_i - \frac{l_i}{2}$$

hvor:

dag_i: kontroldag (dage siden tilførslen af larverne)

l_i: længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Kønsfordeling

52. Kønsfordelinger er kvantale data og vurderes derfor ved hjælp af Fishers eksakte test eller andre egnede metoder. Den naturlige kønsfordeling for C. riparius er en, dvs. der er lige mange hanner og hunner. For begge generationer behandles kønsfordelingsdata ens. Da det maksimale antal individer pr. glas (dvs. 20) er for lavt til en meningsfuld statistisk analyse,

▼M6

lægges det samlede antal fuldt udviklede og levende individer for hvert køn fra alle glas i en koncentration sammen. Disse ikketransformerede data testes i forhold til kontrollen (opløsningsmiddel) eller samlede kontroldata i en 2 × 2 kontingenstabel.

Reproduktion

53. Reproduktion, forstået som befrugtningsevne, beregnes som antallet af æggesnore pr. hun. Mere specifikt deles det samlede antal æggesnore frembragt i et avlsbur med det samlede antal levende og ubeskadigede hunner, der er tilført buret. En NOEC for befrugtningsevne kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test.

54. Æggesnorenes fertilitet bruges til at bestemme antallet af fertile æggesnore pr. hun kvantitativt. Det samlede antal fertile æggesnore frembragt i et avlsbur deles med det samlede antal levende og ubeskadigede hunner, der er tilført buret. En NOEC for fertilitet kan bestemmes via ANOVA-metoder, f.eks. Williams' eller Dunnetts test.

Testrapport

55. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

— fysiske egenskaber og fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, log K_{ow}, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand og sediment osv.)

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet.

Testarter:

— anvendte testorganismer: art, videnskabeligt navn, organismernes herkomst samt dyrkningsbetingelser

— information om, hvordan ægmasse og larver blev håndteret

— information om håndtering af udviklede voksne af første generation ved hjælp af en exhauster osv. (se tillæg 5)

— testorganismernes alder på tidspunktet for første og anden generations overførsel til testglassene.

Testbetingelser:

— anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret (kunstigt) sediment

— naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sedimentet, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening, sedimentets karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)

— formuleret sediment: fremstilling, ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. målt ved begyndelsen af testen)

— fremstilling af testvand (hvis der anvendes rekonstitueret vand) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, hårdhed osv. målt ved begyndelsen af testen)

▼**M6**

— dybde af sediment og overliggende vand for testglas og krystallisationsskåle

— volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand for testglas og krystallisationsskåle

— testglas (materiale og størrelse)

— krystallisationsskåle (materiale og størrelse)

— avlsbure (materiale og størrelse)

— metode til fremstilling af stamopløsninger og testkoncentrationer til testglas og krystallisationsskåle

— tilsætning af testkemikalie i testglas og krystallisationsskåle: testkoncentrationer, antal replikater og brug af eventuelt opløsningsmiddel

— inkubationsbetingelser for testglas: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (bobler pr. sekund)

— inkubationsbetingelser for avlsbure og krystallisationsskåle: temperatur, lysintensitet og -periodicitet

— inkubationsbetingelser for æggesnore på mikroplader (eller andre glas): temperatur, lysintensitet og -periodicitet

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, fremstilling, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme testkemikaliekoncentrationen i testglas og krystallisationsskåle

— kvaliteten af vandet i testglassene og krystallisationsskålene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak

— eventuel udskiftning af fordampet vand i testglassene

— antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag for første og anden generation

— kønsfordeling af udviklede og levende han- og hunindivider pr. behandling for første og anden generation

— antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas for første og anden generation

— procentvis/andel emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider) for første og anden generation

— gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede og levende individer pr. replikat og behandlingshastighed (han- og hunindivider for sig og samlet) for første og anden generation

— antal æggesnore afsat i krystallisationsskålene pr. avlsbur og pr. dag

▼M6

— hver æggesnors karakteristika (størrelse, form og fertilitet)

— befrugtningsevne — samlet antal æggesnore pr. samlet antal hunner, der er tilført avlsburet

— fertilitet — samlet antal fertile æggesnore pr. samlet antal hunner, der er tilført avlsburet

— estimater for toksicitetsendepunkter, f.eks. EC_x-værdier (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og de statistiske metoder, der er anvendt til at beregningen heraf

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.28 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet vand.

(2) N.A. Shobanov, I.I. Kiknadze og M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) R. Fleming et al. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738, august 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, fra WOSTA Workshop, som blev afholdt i Nederlandene.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, revision af den første udgave, dateret juni 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) D. Milani, K.E. Day, D.J. McLeay og R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) T.J. Norberg-King, P.K. Sibley, G.A. Burton, C.G. Ingersoll, N.E. Kemble, S. Ireland, D.R. Mount og C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) V. Taenzler, E. Bruns, M. Dorgerloh, V. Pfeifle og L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Y. Sugaya (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) K. Kawai (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet sediment.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) L. Weltje, H. Rufli, F. Heimbach, J. Wheeler, M. Vervliet-Scheebaum, og M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) M. Oetken, G. Nentwig, D. Löffler, T. Ternes, og J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) B.C. Suedel, og J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) C. Naylor og C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) C.W. Dunnett (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) C.W. Dunnett (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) D.A. Williams (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) D.A. Williams (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) D. Jungmann, C. Bandow, T. Gildemeister, R. Nagel, T.G. Preuss, H.T. Ratte, C. Shinn, L. Weltje og H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J. Soils Sediments 9: 94-102.

(27) J.N.K. Rao og A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) E.R. Christensen (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) R.D. Bruce og D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) W. Slob (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 s., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) D.A. Benoit, P.K. Sibley, J.L. Juenemann, og G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) C. Vogt, D. Belz, S. Galluba, C. Nowak, M. Oetken og J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity* test, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Tillæg 1

Definitioner

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, som bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiket vand eller forurenet vand: det vand, som testkemikaliet er tilsat.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

▼M6

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius*

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kieselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkningsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

Fodring af larver

4. *Chironomus*-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Dette præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.

5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.

6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

▼M6

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner og tynde krop.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Eventuelle ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.

10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der er en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 og K_2HPO_4, idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet.

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makronæringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.
(2) Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0 274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne

Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille en vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

HENVISNINGER

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, red. af M. Streloke og H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

B.P. Elendt og W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

Tillæg 3

Fremstilling af formuleret sediment

SAMMENSÆTNING AF SEDIMENT

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Egenskaber	% sediment tørvægt
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4 - 5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 µm	75 - 76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonat	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledeevne ≤ 10 µS/cm	30-50

FREMSTILLING

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i deioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 °± 2 °C, for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30–50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med $CaCO_3$. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

OPBEVARING

De tørre bestanddele til fremstilling af syntetisk sediment opbevares tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

HENVISNINGER

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

M. Meller, P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel og B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Tillæg 4

Kemiske egenskaber for acceptabelt vand til fortynding

KOMPONENT	KONCENTRA-TIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/1
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/1
Total organisk chlor	< 25 ng/1

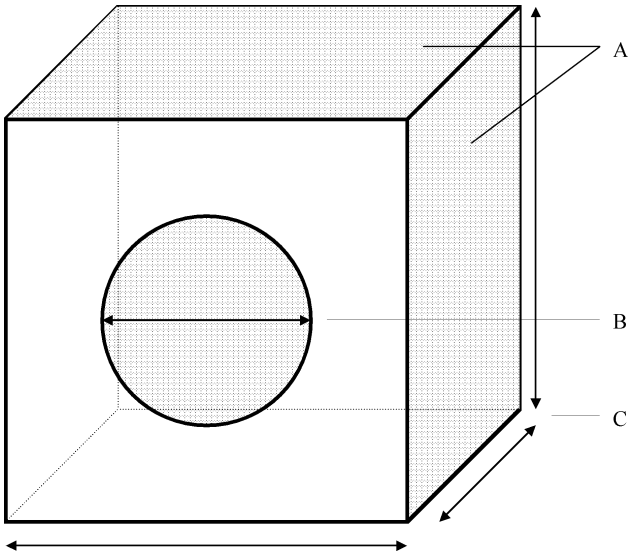
(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og testkemikaliet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

▼**M6**

Tillæg 5

Vejledning i udførelse af test

Eksempel på et bur



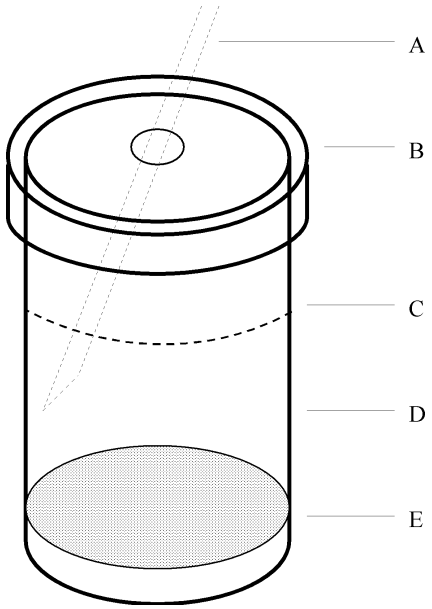
A: gaze øverst og på mindst den ene side af buret (maskestørrelse ca. 1 mm)

B: åbning til anbringelse af udviklede voksne i buret og fjernelse af de lagte æggesnore fra krystallisationsskålene (vises ikke i denne grafik)

C: burstørrelse: minimum 30 cm langt, 30 cm højt og 30 cm bredt

▼**M6**

Eksempel på et testglas:



A: pasteurpipette til tilsætning af det overliggende vand med luft

B: glaslåg for at forhindre udviklede individer i at slippe ud

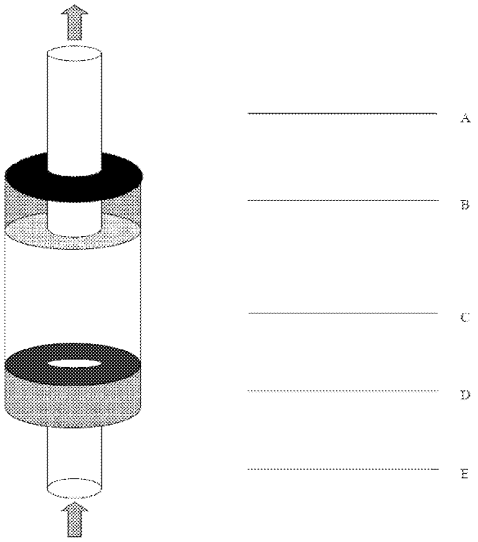
C: vandoverflade

D: testglas (glasbæger, minimum 600 ml)

E: sedimentlag

▼**M6**

Eksempel på en exhauster til at fange voksne individer (pilene viser luftstrømmens retning)



A: glasrør (indvendig diameter ca. 5 mm) forbundet til en selvansugende pumpe

B: prop af vulkaniseret gummi, perforeret med glasrør (A). På indersiden er glasrørets åbning (A) dækket med noget vat og gaze (maskestørrelse ca. 1 mm^2) for at hindre beskadigelse af individerne, når de suges ind i exhausteren

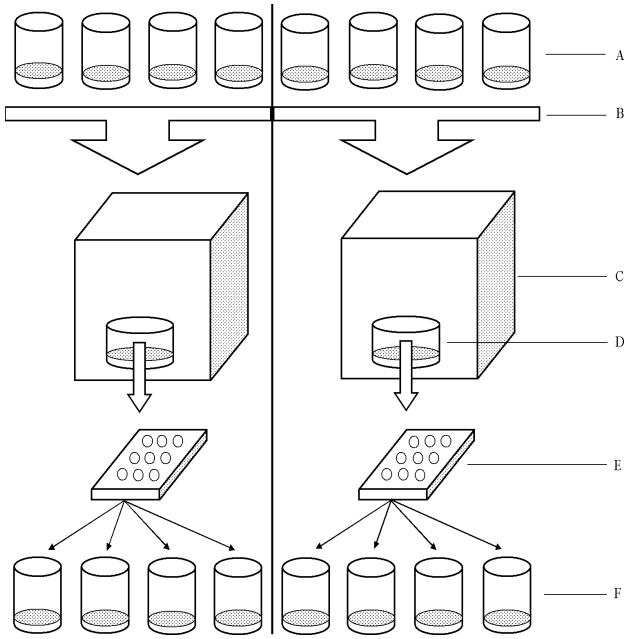
C: gennemsigtig beholder (plast eller glas, længde ca. 15 cm) til indfangede individer

D: prop af vulkaniseret gummi, perforeret med rør (E). Når individerne skal lukkes ind i buret, frigøres prop D fra beholder C

E: rør (plast eller glas, indvendig diameter ca. 8 mm) til at indsamle voksne individer fra glas

▼**M6**

Skematisk fremstilling af en livscyklustest:



A: første generation — testglas indeholdende et sediment- og vandsystem, otte replikater, 20 æglarver pr. glas

B: fire testglas til hvert bur, A og B

C: bure (A og B) til sværmning, parring og æglægning

D: krystallisationsskåle til afsætning af æggesnore

E: mikroplader, en brønd til hver æggesnor

F: anden generation — testglas indeholdende et sediment- og vandsystem, otte replikater, 20 æglarver pr. glas.

▼M6

C.41. TEST AF FISKS KØNSUDVIKLING

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 234 (2011). Den er baseret på en beslutning fra 1998 om at udvikle nye eller opdatere eksisterende testmetoder til screening og testning af potentielle hormonforstyrrende stoffer. Testen af fisks kønsudvikling (FSDT) blev identificeret som en lovende testmetode, der dækker et følsomt livsstadium hos fisk, som reagerer på både østrogen- og androgenlignende kemikalier. Testmetoden gennemgik en validering med deltagelse af flere laboratorier fra 2006 til 2010, hvor japansk risfisk (Oryzias latipes), zebrafisk (Danio rerio) og trepigget hundestejle (Gasterosteus aculeatus) blev valideret, og tykhovedet elritse (Pimephales promelas) blev delvis valideret (41) (42) (43). Denne protokol omfatter japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk. Protokollen er i princippet en forbedring af OECD's TG 210 Fish, Early Life Stage Toxicity Test (1), hvor eksponeringen fortsættes, indtil fiskene er seksuelt differentieret, dvs. omkring 60 dage efter klækning for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk (eksponeringsperioden kan være kortere eller længere for andre arter, som valideres i fremtiden), og endokrine endepunkter tilføjes. FSDT vurderer virkninger i det tidlige livsstadium og potentielle skadelige følger af formodede hormonforstyrrende kemikalier (f.eks. østrogener, androgener og steroidgenesehæmmere) for kønsudviklingen. Med kombinationen af to centrale endokrine endepunkter, vitellogeninkoncentration (VTG) og fænotypisk kønsfordeling, kan testen vise testkemikaliets virkemåde. På grund af den populationsrelevante ændring i fænotypisk kønsfordeling kan FSDT bruges til fare- og risikovurdering. Benyttes testen til fare- eller risikovurdering, bør hundestejler dog ikke bruges, fordi de valideringsdata, som hidtil har været tilgængelige, viste, at testkemikaliernes forandringer af fænotypisk kønsfordeling hos denne art var ualmindelige.

2. Protokollen er baseret på fisk, der via vand eksponeres for kemikalier i den kønslabile periode, hvor fisken forventes at være mest følsom over for virkningerne af hormonforstyrrende kemikalier, som griber forstyrrende ind i kønsudviklingen. To centrale endepunkter måles som indikatorer for endokrine udviklingsafvigelser, nemlig VTG-koncentrationer og kønsfordeling (andele af køn), som bestemmes via histologisk undersøgelse af kønskirtlerne. Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne (vurdering og stadieinddeling af oocyter og sædceller) er valgfri. Endvidere bestemmes det genetiske køn, når det er muligt (f.eks. hos japansk risfisk og trepigget hundestejle). Tilstedeværelsen af en genetisk kønsmarkør er en stor fordel, da den øger troværdigheden af statistikken om kønsfordeling og gør det muligt at konstatere individuel fænotypisk kønsveksling. Andre slutpunkter, der skal måles, omfatter klækningshastighed, overlevelse, længde og kropsvægt. Testmetoden kan muligvis tilpasses andre arter end de ovenfor nævnte, forudsat at de øvrige arter gennemgår en validering svarende til den, som er foretaget for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, at kontrolfiskene er seksuelt differentierede ved afslutningen af testen, at VTG-niveauerne er tilstrækkeligt høje til at afdække signifikante kemikalierelaterede variationer, og at testsystemets følsomhed er fastslået ved hjælp af hormonforstyrrende referencekemikalier ((anti)østrogener, (anti)androgener, aromataseinhibitorer osv.). Endvidere skal en/alle valideringsrapport(er), der omhandler FSDT-data, hvor andre arter er anvendt, gennemgås af OECD, og valideringsresultatet skal anses for tilfredsstillende.

▼M6

Indledende overvejelser og begrænsninger

3. VTG produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som reaktion på cirkulerende endogent østrogen (2). Det er en præcursor for æggeblommeproteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som er under udvikling. VTG-syntesen er meget begrænset, om end sporbar, hos umodne fisk og voksne hanfisk, fordi de mangler tilstrækkeligt cirkulerende østrogen. Dog kan leveren syntetisere og udskille VTG som reaktion på eksogen østrogenstimulation (3) (4) (5).

4. Målingen af VTG benyttes til afdække kemikalier med østrogen, antiøstrogen, androgen virkemåde og kemikalier, der forstyrrer steroidgenese, som f.eks. aromataseinhibitorer. Påvisning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af VTG-induktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer-review. VTG-induktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgener (6) (7). En reduktion af niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17β-østradiol, forårsager et fald i vitellogeninniveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (33). Den biologiske relevans af VTG-reaktionen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og er blevet bredt dokumenteret (8) (9). Det er dog muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikkeendokrine toksiske virkemåder.

5. Der er med succes blevet udviklet og standardiseret flere målemetoder til rutinebrug til kvantitativ bestemmelse af VTG i homogenatprøver af blod, lever, hele kroppen eller hoved/hale indsamlet fra enkeltfisk. Det er tilfældet for zebrafisk, trepigget hundestejle og japansk risfisk og også den delvis validerede art tykhovedet elritse. Artsspecifikke metoder for enzymbundet immunadsorptionsteknik (ELISA), hvor der anvendes immunkemi til kvantitativ bestemmelse af VTG, er tilgængelige (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Hos japansk risfisk og zebrafisk er der en god sammenhæng mellem VTG målt fra blodplasma, lever og homogenatprøver, skønt homogenater normalt viser lidt lavere værdier end plasma (17) (18) (19). Tillæg 5 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til VTG-analyse.

6. Ændring i det fænotypiske kønsfordeling (andele af køn) er et endepunkt, som afspejler kønsveksling. I princippet kan østrogener, antiøstrogener, androgener, antiandrogener og steroidgenesehæmmende kemikalier påvirke kønsfordelingen mellem de fisk, der udvikles (20). Det er påvist, at denne kønsveksling er delvis reversibel hos zebrafisk (21) efter eksponering for østrogenlignende kemikalier, mens kønsveksling efter eksponering for androgenlignende kemikalier er permanent (30). Kønnet defineres som hun, han, interkønnet (både oocyter og sædceller i en kønskirtel) eller udifferentieret, hvilket bestemmes for den enkelte fisk gennem histologisk undersøgelse af kønskirtlerne. Vejledning kan fås i tillæg 7 og i OECD's Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22).

7. Genetisk køn undersøges via genetiske markører, når de findes hos en given fiskeart. Hos japansk risfisk kan hunnens XX- og hannens XY-gener påvises ved polymerasekædereaktion (PCR), eller det Y-bundne »DM domain«-gen (DMY) kan analyseres (DMY-negativ eller -positiv) som beskrevet

▼M6

i (23)(24). Hos trepigget hundestejle er en tilsvarende PCR-metode til genetisk kønsbestemmelse beskrevet i tillæg 10. Hvis det genetiske køn kan knyttes individuelt til det fænotypiske køn, forbedres testens styrke, og genetisk køn bestemmes derfor hos arter med dokumenterede genetiske kønsmarkører.

8. De to centrale endokrine endepunkter, VTG og kønsfordeling, kan tilsammen påvise kemikaliets endokrine virkemåde (tabel 1). Kønsfordelingen er en populationsrelevant biomarkør (25) (26), og for nogle veldefinerede virkemåder kan FSDT-resultaterne bruges til fare- og risikovurderingsformål, når tilsynsorganet finder det passende. Disse virkemåder er for tiden østrogener, androgener og steroidgenesehæmmere.

Tabel 1

Endokrine endepunkters reaktion på kemikaliers forskellige virkemåder

↑ = stigende, ↓ = faldende, — = ikke undersøgt

Virkemåde	VTG ♂	VTG ♀	Kønsfordeling	Henvisninger
Svag østrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑udiff.	(27) (40)
Stærk østrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑udiff., ingen ♂	(28) (40)
Østrogenantagonist	—	—	↓♀, ↑udiff.	(29)
Androgenagonist	↓ eller —	↓ eller —	↑♂, ingen ♀	(28) (30)
Androgenantagonist	—	—	↑♀ ↑interkønnet	(31)
Aromatasehæmmer	↓	↓	↓♀	(33)

9. FSDT dækker ikke fiskenes formeringslivsstadium, og derfor undersøges kemikalier, som formodes at påvirke formeringen ved lavere koncentrationer end kønsudvikling, i en test, der dækker formering.

10. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

11. FSDT in vivo har til formål at påvise kemikalier med androgene og østrogene egenskaber samt antiandrogene, antiøstrogene og steroidgenesehæmmende egenskaber. FSDT-valideringsfaserne (1 og 2) dækkede østrogene, androgene og steroidgenesehæmmende kemikalier. Virkningerne af østrogen- og androgenantagonister i FSDT kan ses i tabel 1, men disse virkemåder er mindre dokumenterede på nuværende tidspunkt.

PRINCIP FOR TESTEN

12. I testen eksponeres fisk fra nybefrugtede æg indtil afslutningen af kønsdifferentieringen for mindst tre koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand. Testbetingelserne bør være gennemstrømning, medmindre dette ikke er muligt på grund af testkemikaliets tilgængelighed eller art (f.eks. begrænset opløselighed). Testen begynder med anbringelse af nybefrugtede æg (før blastocysten har delt sig) i testkamrene. Belastningen af kamrene er

▼M6

beskrevet for hver art i punkt 27. For de validerede fiskearter, japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, afsluttes testen på dag 60 efter udklækning. Ved testens afslutning aflives alle fisk på en human måde. En biologisk prøve (blodplasma, lever eller hoved-/halehomogenat) udtages til VTG-analyse fra hver fisk, og den resterende del fikseres til histologisk vurdering af kønskirtlerne for at bestemme det fænotypiske køn. Eventuelt kan der foretages en histopatologisk undersøgelse (f.eks. stadieinddeling af kønskirtler, interseksualitetens sværhedsgrad). En biologisk prøve (gat- eller rygfinnen) til bestemmelse af det genetiske køn udtages hos arter, der har de relevante markører (tillæg 9 og 10).

13. En oversigt over relevante testbetingelser for validerede arter, japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk, kan ses i tillæg 2.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

14. Der bør foreligge resultater fra en akut-toksicitetstest eller anden kortvarig toksicitetsanalyse [f.eks. testmetode C.14 (34) og OECD's TG 210 (1)], fortrinsvis udført på den art, som er valgt til denne test. Dette indebærer, at testkemikaliets vandopløselighed og damptryk er kendt, og at der foreligger en pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testkamrene med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.

15. Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, pKa, P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C.4) (35).

Godkendelseskriterier for testen

16. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:

— koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV)

— vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end ± 1,5 °C mellem testkamrene og skal holdes inden for de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, som anvendes i testen (tillæg 2)

— der skal foreligge en valideret metode til analyse af eksponeringskemikaliet med en detektionsgrænse et godt stykke under den laveste nominelle koncentration, og der indsamles beviser til påvisning af, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsningen på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier

— den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og, hvor det er relevant, i kontrollerne med opløsningsmiddel skal være større end eller lig med grænserne defineret i tillæg 2

— godkendelseskriterier vedrørende vækst og kønsandele ved afslutningen af testen er baseret på data fra kontrolgrupperne (samlet kontrol for opløsningsmiddel og vand, medmindre de er signifikant forskellige, i så fald kun opløsningsmiddel):

▼M6

		Japansk risfisk	Zebrafisk	Trepigget hundestejle
Vækst	Fiskens vådvægt, duppet tør	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Længde (standard-længde)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Kønsfordeling (% hanner eller hunner)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen statistisk signifikant virkning på overlevelsen og må ikke fremkalde hormonforstyrrende virkninger eller andre negative virkninger på de tidlige livsstadier, hvilket kan afsløres ved en kontroltest med opløsningsmiddel.

Hvis der observeres en afvigelse fra testgodkendelseskriterierne, skal følgerne betragtes i forhold til pålideligheden af testdataene, og disse betragtninger inkluderes i rapporten.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testbeholderne

17. Enhver type glas, rustfrit stål eller andet kemisk inaktivt materiale kan anvendes. Testbeholdernes dimensioner skal være store nok til at opfylde nedenstående kriterier for belastningsgraden. Det anbefales at placere testbeholderne tilfældigt. Et randomiseret design med grupper af testbeholdere, hvor hver koncentration forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system. Testbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

Valg af fiskeart

18. Anbefalede fiskearter er anført i tillæg 2. Procedurerne for inddragelse af nye arter er anført i punkt 2.

Opbevaring af forældrefisk

19. Oplysninger om opbevaring af forældrefisk under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210 (1). Forældrefisk fodres en eller to gange om dagen med passende foder.

Håndtering af embryoner og fiskelarver

20. Indledningsvis kan embryoner og fiskelarver, mens de eksponeres for testkemikaliet, opholde sig i mindre i kar af glas eller rustfrit stål med netvægge, idet disse mindre kar er placeret i testkarret, således at testkemikaliet kan flyde igennem. Man kan skabe et ikketurbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karret op og ned, dog altid med organismerne under overfladen.

21. I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i testkarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes, idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke eksponeres for luft, og net må ikke bruges til at fjerne fisk fra beholderne. Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde.

▼M6

Vand

22. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse, der er mindst lige så god som beskrevet i tillæg 3. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved at reagere med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af totalt organisk kulstof, ledningsevne, pH og opslæmmet tørstof foretages f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) og pesticider foretages, hvis vandkvaliteten er tvivlsom. Nærmere oplysninger om kemisk analyse og vandopsamling kan ses i punkt 34.

Testopløsninger

23. Et gennemstrømningssystem bruges, hvis det er praktisk muligt. Til gennemstrømningstest kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder kontrolleres regelmæssigt i løbet af testen og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumenet af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (1). Der må udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier eller kan adsorbere testkemikaliet.

24. Stamopløsningen fremstilles fortrinsvis uden brug af opløsningsmidler, men ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Hvis testkemikaliet er vanskeligt at opløse i vandet, følges procedurerne i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36). Anvendelse af opløsningsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er anført i (36).

25. Semistatiske testbetingelser bør undgås, medmindre det godtgøres, at der er tvingende årsager hertil i forbindelse med testkemikaliet (f.eks. stabilitet, begrænset tilgængelighed, høj pris eller fare). I den semistatiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen. Enten fremstilles nye testopløsninger i rene testbeholdere, og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt ind i de nye testbeholdere, eller testorganismerne bibeholdes i testbeholderne, medens mindst to tredjedele af testvandet udskiftes dagligt.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Udtagning af æg og varighed

26. For at undgå genetisk skævhed udtages æg fra mindst tre blandede og tilfældigt udvalgte ynglende par eller grupper som indledning på testen. Se beskrivelse af kunstig befrugtning for trepigget hundestejle i tillæg 11. Testen påbegyndes snarest muligt, efter at æggene er blevet befrugtet, idet

▼M6

embryonerne helst skal være nedsænket i testopløsningerne, før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig og senest 12 timer efter befrugtning. Testen fortsættes, indtil kønsdifferentiering i kontrolgruppen er afsluttet (60 dage efter udklækning for japansk risfisk, trepigget hundestejle og zebrafisk).

Belastning

27. Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal være mindst 120 pr. koncentration fordelt på mindst fire replikater (fordeling til kontrol ifølge kvadratrodsreglen accepteres). Æggene fordeles tilfældigt (ved hjælp af statistiske tabeller for randomisering) mellem behandlingerne. Belastningsgraden (se definition i tillæg 1) bør være så lav, at koncentrationen af opløst ilt på mindst 60 % ASV kan opretholdes uden direkte beluftning af beholderne. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsgrad på højst 0,5 g/l pr. døgn og højst 5 g/l opløsning på noget tidspunkt Senest 28 dage efter befrugtning omfordeles antallet af fisk pr. replikat, så hvert replikat indeholder et så lige antal fisk som muligt. Hvis der forekommer dødelighed som følge af eksponering, reduceres antallet af replikater i overensstemmelse hermed, så fisketætheden holdes så lige som muligt mellem behandlingsniveauer.

Lys og temperatur

28. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (se forsøgsbetingelser for FSDT i tillæg 2).

Fodring

29. Foder og fodring er afgørende, og det er væsentligt, at der gives det korrekte foder til hvert stadium med passende tidsintervaller og i en tilstrækkelig mængde til at støtte normal vækst. Foder gives ad libitum, samtidig med at overskydende foder undgås. For at sikre en tilstrækkelig vækstrate fodres fiskene mindst to gange om dagen (dog accepteres en gang om dagen i weekender) med et interval på mindst tre timer mellem hver fodring. Overskydende foder og ekskrementer fjernes efter behov for at undgå akkumulering af affald. Foder og fodringshyppighed justeres til stadighed, i takt med at der indhøstes erfaringer, for at forbedre overlevelse og optimere vækst. Det bør derfor tilstræbes at bekræfte den foreslåede hyppighed med anerkendte eksperter. Der fodres ikke 24 timer før testens afslutning. Eksempler på passende fødemidler er anført i tillæg 2 (se også OECD's Fish Testing Framework (39)).

Testkoncentrationer

30. Testkemikalierne gradueres som beskrevet i tillæg 4. Der anvendes mindst tre testkoncentrationer i mindst fire replikater. Kurven fra de tilgængelige akutte toksicitetstest, som knytter LC_{50} til testperioden, bør tages i betragtning ved valg af området for testkoncentrationerne. Fem testkoncentrationer anbefales, hvis dataene skal bruges til risikovurdering.

31. Det er ikke nødvendigt at teste kemikaliekoncentrationer højere end svarende til 10 % af akutte voksne LC_{50} eller 10 mg/l, afhængigt af hvilken af disse der er lavest. Den maksimale testkoncentration bør være 10 % af LC_{50} på larve-/yngelstadiet.

▼M6

Kontrol

32. Der skal ud over testkoncentrationerne være en kontrol med fortyndingsvand (≥ 4 replikater) og, hvis det er relevant, en kontrol med opløsningsmiddel (≥ 4 replikater). Kun opløsningsmidler, der er blevet undersøgt og har vist, at de ikke har nogen statistisk signifikant indflydelse på testens endepunkter, bør anvendes i testen.

33. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, må dets endelige koncentration ikke være højere end 0,1 ml/l (36), og det skal være den samme koncentration i alle testbeholdere med undtagelse af kontrollen med fortyndingsvand. Det bør dog så vidt muligt undgås at bruge sådanne opløsningsmidler, ellers holdes opløsningsmidlets koncentrationer på et minimum.

Hyppighed af analyser og målinger

34. Der udføres en kemisk analyse af testkemikaliets koncentration før indledning af testen for at kontrollere, at den opfylder godkendelseskriterierne. Alle replikater analyseres hver for sig ved påbegyndelse og afslutning af testen. Et replikat pr. testkoncentration analyseres mindst en gang om ugen under testen, idet der systematisk veksles mellem replikaterne (1,2,3,4,1,2 osv.). Opbevares prøver med henblik på analyse på et senere tidspunkt, valideres opbevaringsmetoden for prøverne på forhånd. Prøverne filtreres (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm) eller centrifugeres for at sikre, at bestemmelserne foretages på testkemikaliet i opløsning.

35. Under testen måles opløst ilt, pH, samlet hårdhed, ledningsevne, saltindhold (hvis det er relevant) og temperatur i alle testbeholdere. Som minimum måles opløst ilt, saltindhold (hvis det er relevant) og temperatur en gang om ugen og pH, ledningsevne og hårdhed ved testens begyndelse og afslutning. Temperaturen overvåges fortrinsvis kontinuerligt i mindst en testbeholder.

36. Resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.

Observationer og målinger

Fosterets udviklingstrin

37. Eksponeringen påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtning, og før blastocysten har delt sig, og senest 12 timer efter befrugtning for at sikre eksponering under den tidlige fosterudvikling.

Udklækning og overlevelse

38. Udklækning og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. Døde embryoner, larver og fiskeyngel fjernes med det samme, eftersom de hurtigt kan gå i opløsning og blive bidt i stykker af de øvrige fisk. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke bliver ramt eller fysisk beskadigede, da de er meget sarte og følsomme. Kriterier for død varierer efter stadium:

— for æg: særligt i de tidlige stadier et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed

▼M6

— for larver og fiskeyngel: manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

Abnormt udseende

39. Antallet af larver eller fisk med abnorm kropsform registreres, og abnormitetens udseende og art beskrives. Det skal bemærkes, at abnorme embryoner og larver optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Abnorme dyr skal kun fjernes fra testkamrene, når de er døde. I overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål, skal dyr, hvis abnormiteter resulterer i smerte, lidelse og angst eller varigt men, og hvis død på pålidelig vis kan forudses, bedøves og aflives ifølge beskrivelsen i punkt 44 og med henblik på dataanalyse behandles som dødelighed.

Abnorm adfærd

40. Abnorm adfærd, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning, atypisk ubevægelighed og atypisk fourageringsadfærd, noteres når det forekommer.

Vægt

41. Ved testens afslutning aflives alle overlevende fisk (bedøves, hvis der skal tages blodprøver), og individuel vådvægt (duppet tør) måles.

Længde

42. Ved testens afslutning måles de enkelte individers længde (standardlængde).

43. Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan registreres:

— kumulativ dødelighed

— antal sunde fisk ved afslutning af testen

— begyndelses- og sluttidspunkt for klækning

— længde og vægt af overlevende dyr

— antal deforme larver

— antal fisk, der opfører sig abnormt.

Prøveudtagning af fisk

44. Prøver af fisk udtages ved testens afslutning. Fiskeprøver aflives med f.eks. MS-222 (100-500 mg pr. l med en buffer af 200 mg $NaHCO_3$ pr. l) eller FA-100 (4-allyl-2-methoxyphenol: eugenol) og individuelt målt og vejet som vådvægt (duppet tør) eller bedøvet, hvis der skal tages en blodprøve (se punkt 49).

Prøveudtagning til VTG-analyse og kønsbestemmelse gennem histologisk vurdering

45. Der udtages prøver af alle fisk, som klargøres med henblik på analyse af køn og VTG. Der foretages en histologisk analyse af alle fisk for at bestemme køn. Til VTG-målinger accepteres delprøver på mindst 16 fisk

▼M6

fra hvert replikat. Der analyseres flere fisk med henblik på VTG, hvis resultaterne af delprøverne viser sig at være uklare.

46. Prøveudtagningsproceduren for VTG og kønsbestemmelse afhænger af VTG-analysemetoden:

Hoved-hale-homogenatmetode til VTG-analyse

47. Fisken aflives. Hoved og hale af hver fisk skilles fra fiskens krop ved hjælp af en skalpel med snit lagt lige bag brystfinnerne og lige bag rygfinnen (se figur 1). Hoved- og haledelen fra hver fisk samles, vejes og nummereres individuelt, fryses i flydende kvælstof og opbevares ved – 70 °C eller derunder med henblik på VTG-analyse. Fiskens kropsdel nummereres og fikseres i et egnet fikseringsmiddel med henblik på histologisk vurdering (22). Ved hjælp af denne metode vurderes VTG og histopatologi for hvert individ, og en mulig ændring i VTG-niveau kan således knyttes til fiskens fænotypiske køn eller fiskens genetiske køn (japansk risfisk og trepigget hundestejle). Yderligere oplysninger kan ses i vejledning til homogenisering (tillæg 5) og vejledning til kvantitativ bestemmelse af VTG (tillæg 6).

Lever-homogenatmetode til VTG-analyse

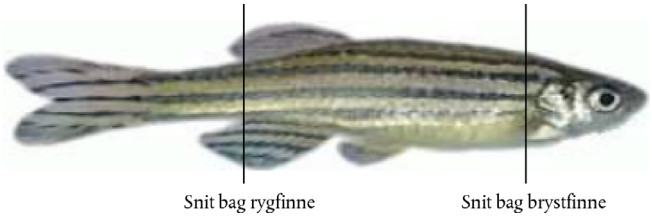
48. Fisken aflives. Leveren skæres ud og opbevares ved – 70 °C eller derunder. Anbefalede procedurer for udskæring af lever og forbehandling kan ses i OECD TG 229 (37) eller kapitel C.37 i dette bilag (38). Leverne homogeniseres herefter hver for sig som beskrevet i OECD TG 229 eller kapitel C.37 i dette bilag. Den udtagne supernatant bruges til at måle VTG med en homolog ELISA-teknik (se et eksempel på kvantitativ bestemmelse for zebrafisk i bilag 6 eller OECD TG 229 (37) for japansk risfisk). Ifølge denne metode er det også muligt at få individuelle fiskedata om både VTG og kønskirtelhistologi.

Blodplasmametode til VTG-analyse

49. Blod udtages fra den bedøvede fisk ved hjertepunktur, snit i halevene eller hale og centrifugeres ved 4 °C med henblik på udtagning af plasma. Plasmaet opbevares ved – 70 °C eller herunder indtil brug. Fisken aflives og fikseres til histologisk undersøgelse. Både plasmaprøver og fisk nummereres individuelt for at sammenholde VTG-niveauer med fiskens køn.

Figur 1

Sådan udskæres en fisk med henblik på måling af VTG i hoved-/halehomogenat og histologisk vurdering af midterpartiet.



▼M6

Genetisk kønsbestemmelse

50. En biologisk prøve til bestemmelse af det genetiske køn udtages fra hver enkelt fisk hos arter, der har de relevante markører. For japansk risfisk udtages gatfinne eller rygfinne. Tillæg 9 indeholder en detaljeret beskrivelse, bl.a. udtagning af vævsprøver og kønsbestemmelse ved en PCR-metode. For den trepiggede hundestejle findes der ligeledes en beskrivelse af udtagning af vævsprøver og en kønsbestemmelsesmetode ved hjælp af PCR i tillæg 10.

VTG-måling

51. Målingen af VTG baseres på en kvantitativ analytisk valideret metode. Der skal foreligge oplysninger om variabiliteten inden for testen og mellem test i den metode, som et givet laboratorium benytter. Kilden til variabilitet i og mellem laboratorier er (højst sandsynligt) baseret på fiskepopulationens forskellige udviklingsstadier. I betragtning af variabiliteten i VTG-målingen bør NOEC baseret på dette endepunkt alene behandles med stor forsigtighed. Der findes forskellige metoder til at vurdere VTG-produktion hos de fiskearter, som behandles i dette assay. En måleteknik, som både er relativt følsom og specifik, er bestemmelsen af proteinkoncentrationer via enzymbundet immunosorbent assay (ELISA). Homologe antistoffer (fremstillet mod VTG i samme art) og de fleste vigtige homologe standarder bør anvendes.

Kønsbestemmelse

52. Afhængigt af VTG-prøveudtagningsproceduren anbringes hele fisken eller det resterende midterparti af hver fisk i en på forhånd mærket behandlingskassette og fikseres i et egnet fikseringsmiddel med henblik på histologisk bestemmelse af køn (også valgfrit for vurdering af stadieinddeling af kønskirtler). Vejledning om fiksering og indlejring kan fås i tillæg 7 og i OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22). Efter behandling indlejres fisken i paraffinblokke. Individerne anbringes på langs i hver paraffinblok. Der udtages mindst seks længdesnit (3-5 μm i tykkelse) i et frontalplan, der indeholder kønskirtelvæv fra begge kønskirtler fra hvert individ. Intervallet mellem disse snit skal være ca. 50 μm for hanner og 250 μm for hunner. Eftersom hver blok ofte vil indeholde hanner og hunner (hvis der er indlejret mere end et individ i hver blok), skal intervallet mellem snit fra disse blokke være ca. 50 μm, indtil der er opnået mindst seks snit af kønskirtlerne fra hver han. Derefter kan intervallet mellem snit øges til ca. 250 μm for hunnerne. Snittene farves med hematoxylin and eosin og undersøges ved lysmikroskopi med fokus på køn (han, hun, interkønnet eller udifferentieret). Interkønnet defineres som tilstedeværelse af mere end en oocyt i testes pr. seks analyserede snit eller spermatogene celler (ja/nej) i ovarierne. Histopatologisk undersøgelse og stadieinddeling af ovarier er valgfri, men hvis den foretages, analyseres resultaterne statistisk og registreres. Det skal bemærkes, at nogle fiskearter naturligt mangler et fuldt udviklet par kønskirtler, og at der måske kun er en kønskirtel til stede (f.eks. japansk risfisk og undertiden zebrafisk). Alle disse observationer registreres.

53. Genetisk kønsbestemmelse hos individuelle japanske risfisk er baseret på tilstedeværelse eller fravær af risfiskens hankønsbestemmende gen, DMY, der sidder på Y-kromosomet. Risfiskens genotypiske køn kan identificeres ved at sekventere DMY-genet fra DNA ekstraheret fra f.eks. et stykke

▼M6

gatfinne eller rygfinne. Tilstedeværelsen af DMY viser et XY-(han)individ uanset fænotype, mens fraværet af DMY viser et XX-(hun)individ) uanset fænotype (23). Vejledning i fremstilling af vævspræparater og PCR-metoden er anført i bilag 9. Den genetiske kønsbestemmelse af en trepigget hundestejle foretages også efter en PCR-metode, der er beskrevet i bilag 10.

54. Forekomsten af interkøn (se definition i tillæg 1) registreres.

Sekundære kønskarakteristika

55. Sekundære kønskarakteristika er hormonstyret hos arter som japansk risfisk. Derfor foretages observationer af fiskens fysiske udseende, hvis det er muligt, ved eksponeringens afslutning. Hos japansk risfisk er papillardannelsen på den bageste del af gatfinnen, hos hunner androgenfølsom. Kapitel C.37 i dette bilag (38) indeholder relevante fotografier af sekundære kønskarakteristika for hanner og androgene hunner.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

56. Det er vigtigt, at endepunktet bestemmes af den stærkest mulige, valide statistiske test. Replikatet er forsøgsenheden, men variabiliteten mellem replikater bør medtages i den statistiske test. Der findes et beslutningsflowdiagram i tillæg 8, som kan hjælpe med at afgøre, hvilken statistisk test som det vil være mest hensigtsmæssigt at bruge baseret på kendetegnene ved de data, der opnås fra testen. Det statistiske signifikansniveau er 0,05 for alle omfattede endepunkter.

Kønsandele og genetisk køn

57. Kønsandelene analyseres for en signifikant effekt (NOEC/LOEC-metoden) af eksponering efter Jonckheere-Terpstra (trend test), hvis der er tale om en monoton dosisrespons. Hvis der ikke påvises monotoni, anvendes en parvis test: Brug Dunnett's test, hvis der kan opnås normalitet og homogen varians. Brug Tamhane-Dunnett, hvis der forekommer heterogen varians. Ellers brug en eksakt Mann-Whitney-test med Bonferroni-Holm-justering. Et flowdiagram med beskrivelse af statistikker for kønsandele er anført i tillæg 8. Kønsandelene præsenteres i tabeller som koncentrationsandele ± standardafvigelser for hanner, hunner, interkønnede og udifferentierede. Statistisk signifikans fremhæves. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42). Genetisk køn registreres som en procentdel af fænotypisk kønsveksling for hanner, hunner, interkønnede og udifferentierede.

VTG-koncentrationer

58. VTG-koncentrationer analyseres for signifikant effekt (NOEC-/LOEC-metode) af eksponeringen. Dunnett-testen foretrækkes frem for t-testen med Bonferroni-korrektion. Hvis der benyttes en Bonferroni-korrektion, foretrækkes Bonferroni-Holm-korrektionen. Der bør være mulighed for log-transformation af VTG for at opnå normalitet og varianshomogenitet. Såfremt koncentrationsresponsen stemmer overens med monotonien, foretrækkes JonckheereTerpstra-testen herefter frem for nogen af de ovennævnte. Bruges en t-test eller Dunnett's test, er en ANOVA-signifikant F-test ikke

▼M6

nødvendig for at gå videre. Se yderligere oplysninger i flowdiagrammet i tillæg 8. Resultater registreres i tabeller som koncentrationsgennemsnit ± standardafvigelser for hanner, hunner, interkønnede og udifferentierede hver for sig. Statistisk signifikans for fænotypiske hunner og fænotypiske hanner fremhæves. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42).

Testkemikalie: faktiske koncentrationer

59. De faktiske koncentrationer af testkemikaliet i kamrene analyseres i frekvenser og beskrives i punkt 34. Resultaterne registreres i tabeller som gennemsnitskoncentration ± standardafvigelse på grundlag af replikat og på grundlag af koncentration med fremhævede oplysninger om antal prøver og resultater, der afviger fra den gennemsnitlige behandlingskoncentration ± 20 %. Eksempler kan ses i FSDT Phase 2 validation report (42).

Fortolkning af resultaterne

60. Hvor den målte koncentration af testkemikaliet i testopløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtighed.

Testrapport

61. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— Relevante fysisk-kemiske egenskaber, kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet.

Testbetingelser:

— anvendt testprocedure (f.eks. gennemstrømning semistatisk/udskiftning), testdesign, herunder testkoncentrationer, metode til fremstilling af stamopløsninger (i et bilag), udskiftningsfrekvens (hvis der bruges opløsningsmiddel og koncentrationer heraf, skal det anføres)

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnit af de målte værdier og standardafvigelser i testbeholderne og metoden, hvorved de er opnået (den anvendte analysemetode anføres i et bilag) samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentrationer i opløsning

— vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde, fodermængde og fodringshyppighed samt analyser for kontaminanter (f.eks. PCB'er, PAH'er og organiske chlorpesticider), hvis det er relevant.

Resultater

— Dokumentation for, at kontrollerne opfyldte validitetskriterierne: data vedrørende udklækningshastighed anføres i tabeller som en procentdel pr. replikat og pr. koncentration. Resultater, der afviger fra godkendelseskriterierne (i kontrollerne), fremhæves. Overlevelsesgraden udtrykkes som en procentdel pr. replikat og pr. koncentration. Resultater, der afviger fra validitetskriterierne (i kontrollerne), fremhæves.

— Tydelig angivelse af de resultater, som er opnået for de forskellige observerede endepunkter: fosteroverlevelse og -udklækningssucces, ydre abnormiteter, længde og vægt, VTG-målinger (ng/g homogenat, ng/ml plasma eller ng/mg lever), histologisk undersøgelse af kønskirtler,

▼M6

kønsfordeling, data om genetisk køn, forekomst af eventuelt usædvanlige reaktioner hos fiskene og eventuelt synlige virkninger af testkemikaliet.

62. Resultaterne præsenteres som gennemsnitsværdier ± standardafvigelser eller standardfejl. Statistikkerne registreres som minimum som NOEC og LOEC og konfidensintervaller. Det statistiske flowdiagram (tillæg 8) skal følges.

LITTERATUR

(1) OECD (1992), Fish, *Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen og J.P. Sumpter, 1996, »Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals«, Environmental Toxicology and Chemistry 15, s. 194-202.

(3) J.P. Sumpter, og S. Jobling, 1995, »Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment«, Environmental Health Perspectives 103, s. 173-178.

(4) C.R. Tyler, R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix og H. Trip (1999), »An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin«, Environmental Toxicology and Chemistry 18, s. 337-347.

(5) H. Holbech, L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen og P. Bjerregaard (2001a), »Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, s. 119-131.

(6) L. Andersen, P. Bjerregaard og B. Korsgaard (2003), »Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters«, Fish Physiology and Biochemistry 28, s. 319-321.

(7) S. Orn, H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren og G.I. Petersen (2003), »Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone«, Aquatic Toxicology 65, s. 397-411.

(8) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla og C.R. Tyler (2002), »Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances«, Environmental Toxicology and Chemistry 21, s. 319-326.

(9) S.W. Sun, J.M. Zha, P.A. Spear og Z.J. Wang (2007), »Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, s. 533-541.

(10) L.G. Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), »Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, s. 113-125.

(11) F. Brion, B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr og J.M. Porcher (2002), »Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)«, Environmental Toxicology and Chemistry 21, s. 1699-1708.

(12) K. Nishi, M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara og E. Tamiya (2002), »Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, s. 161-169.

(13) E. Hahlbeck, I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James og B.E. Bengtsson (2004), »The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney

▼**M6**

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction«, Aquatic Toxicology 70, s. 311-326.

(14) N. Tatarazako, M. Koshio, H. Hori, M. Morita og T. Iguchi (2004), »Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka«, Journal of Health Science 50, s. 301-308.

(15) J.K. Eidem, H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson og A. Goksoyr (2006), »Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology«, 78, s. 202-206.

(16) K.M. Jensen og G.T. Ankley (2006), »Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)«, Ecotoxicology and Environmental Safety 64, s. 101-105.

(17) H. Holbech, G.I. Petersen, A. Norman, S. Örn, L. Norrgren og P. Bjerregaard (2001b), »Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)«, Nordisk Ministerråd, TemaNord 2001:597, s. 48-51.

(18) B.M. Nilsen, K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher og A. Goksoyr (2004), »Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening«, Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, s. 621-633.

(19) S. Orn, S. Yamani og L. Norrgren (2006), »Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone«, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, s. 237-243.

(20) S. Scholz og N. Kluver (2009), »Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3«, s. 136-151.

(21) M. Fenske, G. Maack, C. Schafers og H. Segner (2005), »An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio«, Environmental Toxicology and Chemistry 24, s. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) T. Kobayashi, M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata og Y. Nagahama (2004), »Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes«, Developmental Dynamics 231, s. 518-526.

(24) A. Shinomiya, H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi og M. Sakaizumi (2004), »Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations«, Zoological Science 21, s. 613-619.

(25) K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak og R.W. Flick (2007), »Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen«, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, s. 8897-8901.

(26) V.P. Palace, R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron og K.A. Kidd (2009), »Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake«, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, s. 1920-1935.

(27) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno og C.R. Tyler (2006), »Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)«, Aquatic Toxicology 77, s. 279-290.

▼**M6**

(28) H. Holbech, K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren og P. Bjerregaard (2006), »Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, s. 57-66.

(29) L. Andersen, K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard og P. Bjerregaard (2004), »Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)«, Fish Physiology and Biochemistry 30, s. 257-266.

(30) J.E. Morthorst, H. Holbech og P. Bjerregaard (2010), »Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations«, Aquatic Toxicology 98, s. 336-343.

(31) Y. Kiparissis, T.L. Metcalfe, G.C. Balch og C.D. Metcalf (2003), »Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)«, Aquatic Toxicology 63, s. 391-403.

(32) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley og C.R. Tyler (2004), »Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development«, Aquatic Toxicology 70, s. 11-21.

(33) K. Kinnberg, H. Holbech, G.I. Petersen og P. Bjerregaard (2007), »Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)«, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, s. 165-170.

(34) Kapitel C.14 i dette bilag, Væksttest på fiskeyngel.

(35) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Kapitel C.37 i dette bilag, 21-dages assay med fisk: En korttidsscreeningstest for østrogene og androgene virkninger og aromatasehæmning.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris.

(40) C. Schäfers, M. Teigeler, A. Wenzel, G. Maack, M. Fenske og H. Segner (2007), »Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio« Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 s. 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. EFT L 276 af 20.10.2010, s. 33.

▼**M6**

Tillæg 1

Forkortelser og definitioner

Slutpunkt: skaber effekt på populationsniveau

ASV: air saturation value = luftmætning

Biomarkør: skaber effekt på individuelt niveau

Kemikalie: et stof eller en blanding

Dph: days post hatch = dage efter udklækning

DMY: Y-specifikt DM-domain-gen, der er nødvendig for udvikling af hanner hos japansk risfisk

ELISA: Enzymkoblet immunadsorptionsteknik

Fiskevægt: Fiskens vådvægt (duppet tør)

FSDT: Test af fisks kønsudvikling

HPG-aksen: Hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen

Interkønnet fisk: Fisk med mere end en oocyt i testes pr. 6 analyserede snit eller spermatogene celler i ovarierne (ja/nej)

Belastningsgrad: fiskens vådvægt pr. vandvolumen

MOA: Virkningsmekanisme

RT-PCR: revers transskriptasepolymerasekædereaktion

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode

Udifferentierede fisk: fisk, hvis kønskirtler ikke viser synlige kønsceller

VTG: Vitellogenin

▼**M6**

Tillæg 2

Testbetingelser for FSDT (ferskvandsarter)

1. Anbefalet art	Japansk risfisk (Oryzias latipes)	Zebrafish (Danio rerio)	Trepigget hundestejle (Gasterostreus aculeatus)
2. Testtype	Gennemstrømning eller semistatisk	Gennemstrømning eller semistatisk	Gennemstrømning eller semistatisk
3. Vandtemperatur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektret)	Fluorescerende pærer (bredspektret)	Fluorescerende pærer (bredspektret)
5. Lysintensitet	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode	12-16 t. lys, 8-12 t. mørke	12-16 t. lys, 8-12 t. mørke	16 t. lys, 8 t. mørke
7. Mindste kammerstørrelse	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l	Individuelle kamre skal indeholde et vandvolumen på minimum 7 l
8. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
9. Testorganismernes alder ved eksponeringens start	Nybefrugtede æg (tidligt blastulastadie)	Nybefrugtede æg (tidligt blastulastadie)	Nyligt befrugtede æg
10. Antal æg pr. behandling	minimum 120	minimum 120	minimum 120
11. Antal behandlinger	Minimum 3 (plus passende kontroller)	Minimum 3 (plus passende kontroller)	Minimum 3 (plus passende kontroller)
12. Antal replikater pr. behandling	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratrodsreglen)	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratrodsreglen)	Minimum 4 (medmindre fordeling til kontrol ifølge kvadratrodsreglen)
13. Fodring	Levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.	Specialyngelfoder, levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.	Levende Artemia, frossen voksen saltsøkrebs, foder i flager osv. Det anbefales at fodre to gange dagligt.
14. Beluftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % mætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % mætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 70 % mætning

▼**M6**

15. Fortyndingsvand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand	Rent overflade-, brønd- eller rekonstitueret vand
16. Varighed af eksponering for testkemikaliet	60-dph	60-dph	60-dph
17. Biologiske endepunkter	Klækningssucces, overlevelse, makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, genetisk køn Kønsfordeling	Klækningssucces, overlevelse makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, kønsfordeling	Klækningssucces, overlevelse makromorfologi, VTG, histologisk undersøgelse af kønskirtler, kønsfordeling
18. Testgodkendelseskriterier for samlede kontrolreplikater	Klækningssucces > 80 %	Klækningssucces > 80 %	Klækningssucces > 80 %
	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %	Overlevelse efter klækning ≥ 70 %
	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tørre) > 150 mg	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tør) > 75 mg	Vækst (fiskens vådvægt, duppet tør) > 120 mg
	Længde (standardlængde) > 20 mm	Længde (standardlængde) > 14 mm	Længde (standardlængde) > 20 mm
	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %	Kønsfordeling (% hanner eller hunner) 30-70 %

▼**M6**

Tillæg 3

Kemiske egenskaber for acceptabelt vand til fortynding

KOMPONENT	KONCENTRATION
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/1
Total organiske chlorpesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/1
Total organisk chlor	< 25 ng/1

▼**M6**

Tillæg 4

Fra testmetode C.14 / vejledning i testkoncentrationer

Kolonne (antal koncentrationer mellem 100 og 10 eller mellem 10 og 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) En række bestående af tre (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en kolonne. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i kolonne (x) findes i kolonne (2x + 1). De anførte værdier kan repræsentere koncentrationer udtrykt i procent pr. volumen eller vægt (mg/l eller µg/l). Værdierne kan multipliceres eller divideres med en hvilken som helst potens af 10, alt efter hvad der er aktuelt. Kolonne 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

▼M6

Tillæg 5

Vejledning i homogenisering af hoved og hale fra yngel af zebrafisk, tykhovedet elritse, trepigget hundestejle og japansk risfisk

Formålet med dette afsnit er at beskrive de procedurer, der går forud for en kvantitativ bestemmelse af VTG-koncentrationen. Der kan anvendes andre procedurer, som fører til en sammenlignelig kvantitativ bestemmelse af VTG. Det er valgfrit, om man vil bestemme VTG-koncentrationen i blodplasma eller lever i stedet for hoved-/halehomogenat.

Fremgangsmåde

1. Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.

2. Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med testbeskrivelsen. **Vigtigt**: Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »VTG-forurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikkeinducerede hanner.

3. Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.

4. Når delene er vejet, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og fryses ved — 80 °C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is, og resultatet er en homogen masse). **Vigtigt**: *Rørene nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropsparti, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.*

5. Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold **homogeniseringsbuffer** (*) på 4-10 gange vævsvægten (bemærk fortyndingen). Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. **Vigtigt**: *Der bruges nye pistiller til hver fisk.*

6. Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved **4 °C** ved 50 000 g i 30 min.

7. Anvend en pipette til at fordele portioner à 20-50 µl (bemærk mængden) supernatant i **mindst to** rør ved at dyppe spidsen af pipetten under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.

8. Rørene opbevares ved — 80 °C indtil brug.

(*) *Homogeniseringsbuffer:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaseinhibitorblanding (eller tilsvarende proteaseinhibitorblandinger).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv) produktnummer P 8340.

Bemærk: Homogeniseringsbufferen skal anvendes på fremstillingsdagen. Anbringes på is under brug.

▼M6

Tillæg 6

Vejledning i kvantitativ bestemmelse af vitellogenin i hoved- og halehomogenat fra zebrafish (danio rerio) (ændret fra holbech et al., 2001). Der kan benyttes andre procedurer, hvor der anvendes homologe antistoffer og standarder.

1. Mikrotiterplader (certificeret Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danmark), som tidligere er coatet med 5 µg/ml IgG-antistoffer mod zebrafisk-lipovitellin, optøs og vaskes tre gange med vaskebuffer (*).

2. Vitellogeninstandard ([1]) af renset zebrafisk fortyndes serielt til 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 og 20 ng/ml i fortyndingsbuffer (**), og prøverne fortyndes mindst 200 gange (for at forebygge matrixeffekt) i fortyndingsbuffer og påføres pladerne. Der foretages en dobbelt assaykontrol. 150 µl tilsættes hver brønd. Standarderne anvendes in duplo og prøverne in triplo. Inkuberes natten over ved 4 °C på et rystebord.

3. Pladerne vaskes fem gange med vaskebuffer (*).

4. HRP bundet til en dextrankæde (f.eks. AMDEX A/S, Danmark) og konjugerede antistoffer fortyndes i vaskebuffer. Den faktiske fortynding afviger efter parti og alder. 150 µl tilsættes hver brønd, og pladerne inkuberes i en time ved stuetemperatur på et rystebord.

5. Pladerne vaskes fem gange med vaskebuffer (*), og bunden af pladerne renses omhyggeligt med ethanol.

6. 150 µl TMB plus (***) tilføres hver brønd. Beskyt pladen mod lys med stanniol og hold øje med farveudviklingen på et rystebord.

7. Når standardkurven er fuldt udviklet, standses enzymaktiviteten ved at tilsætte 150 µl 0,2 M H_2SO_4 til hver brønd.

8. Absorbansen måles ved 450 nm (f.eks. på en Molecular Devices Thermomax-mikropladeaflæser). Data analyseres på den tilknyttede software (f.eks. Softmax).

(*) Vaskebuffer:

PBS-stam (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Juster pH til 7,3 og fyld op til 5 l med millipore H_2O. Opbevar ved 4 °C.

(**) Fortyndingsbuffer:

PBS-stam (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Juster pH til 7,3 og fyld op til 1 l med millipore H_2O. Opbevar ved 4 °C.

(***) TMB plus er et brugsklart substrat fremstillet af KemEnTec (Danmark). Det er lysfølsomt. Opbevar ved 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), renset ifølge: N.D. Denslow, M.C. Chow, K.J. Kroll og L. Green (1999), Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) PBS stam

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Juster pH til 6,8 og fyld op med millipore H_2O til 2 l. Opbevar ved stuetemperatur.

▼M6

Tillæg 7

Vejledning i fremstilling af vævssnit til kønsbestemmelse og stadieinddeling af kønskirtler

Formålet med dette afsnit er at beskrive de procedurer, der går forud for vurderingen af histologiske snit. Der kan anvendes andre procedurer, som fører til en lignende kønsbestemmelse og stadieinddeling af kønskirtler.

Med nogle få undtagelser er disse procedurer de samme for japansk risfisk (JMD) og zebrafisk (ZF).

Aflivning, obduktion og fiksering af væv

Mål:

1. at sikre en human aflivning af fisk

2. at opnå den nødvendige kropsvægt og de nødvendige mål

3. at vurdere sekundære kønskarakteristika

4. at dissekere væv til VTG-analyse

5. at fiksere kønskirtlerne.

Fremgangsmåder:

1. Fisk aflives umiddelbart før obduktion. Medmindre der er mange prosektorer til rådighed, bør mange fisk derfor ikke aflives samtidig.

2. Ved hjælp af en lille ketsjer fjernes en fisk fra forsøgskammeret og transporteres til obduktionsområdet i transportbeholderen.

3. Fisken anbringes i aflivningsopløsningen. Fisken fjernes fra opløsningen, når vejrtrækningen er ophørt, og fisken ikke reagerer på eksterne stimuli.

4. Fisken vejes i våd tilstand.

5. Med henblik på fremstilling af væv til VTG-analyse kan fisken anbringes på en korkplade på præparatbordet i et dissektionsmikroskop.

   a. For zebrafisk skæres hovedet lige bag brystfinnen, og halen skæres lige bag rygfinnen.

   b. For japansk risfisk åbnes abdomen ved en omhyggelig incision, der strækker sig langs den ventrale midterlinje fra skulderåget til et punkt lige oven for gattet. Ved hjælp af små pincetter og en lille saks fjernes leveren forsigtigt.

6. Prøver til VTG-analyse anbringes i eppendorfrør og fryses straks i flydende kvælstof.

7. Kadaveret, herunder kønskirtlerne, anbringes i en på forhånd mærket vævskassette af plast, som overføres til Davidson's eller Bouin's fikseringsmiddel. Fikseringsmidlets volumen skal være mindst 10 gange den tilnærmede vævsvolumen. Fikseringsbeholderen rystes forsigtigt i fem sekunder for at fjerne luftbobler fra kassetten.

8. a. Alt væv bliver liggende i Davidson's fikseringsmiddel natten over, hvorefter det den næste dag overføres til individuelle beholdere med 10 % neutralbufret formalin. Kassettebeholderne rystes forsigtigt i fem sekunder for at sikre en tilstrækkelig gennemtrængning af formalin i kassetterne.

▼M6

b. Vævene bliver liggende i Bouins fikseringsmiddel i 24 timer, hvorefter de overføres til 70 % ethanol.

Vævsbehandling

Mål:

1. at tørre væv med henblik på tilstrækkelig gennemtrængning af paraffin

2. at behandle vævet med paraffin for at opretholde vævets integritet og skabe en fast overflade til mikrotomi.

Fremgangsmåder:

3. Mærkede vævskassetter fjernes fra opbevaringen i formalin/ethanol, og kassetterne anbringes i behandlingskurven/-ene. Behandlingskurven indsættes i vævsbehandlingsenheden.

4. Behandlingsplanen vælges.

5. Når vævsbehandlingsenheden har afsluttet behandlingscyklussen, kan kurven/-ene overføres til den indlejrede station.

Indlejring

Formål:

at vende prøven korrekt i størknet paraffin med henblik på mikrotomi.

Fremgangsmåder:

1. Kassettekurven/-ene fjernes fra behandlingsenheden og nedsænkes i det paraffinfyldte forkammer i indlejringsstationens varmekonsol, eller kassetterne flyttes til en separat paraffinvarmer.

2. Den første kassette, der skal indlejres, fjernes fra forkammeret i varmekonsollen eller paraffinvarmeren. Kassettelåget fjernes og kasseres, og kassettemærket kontrolleres i forhold til dyrejournalerne for at løse potentielle uoverensstemmelser før indlejring.

3. Der vælges en indlejringsform i passende størrelse.

4. Formen holdes under dispenserens tud og fyldes med smeltet paraffin.

5. Prøven fjernes fra kassetten og anbringes i den smeltede paraffin i formen. Dette gentages med 4-8 prøver for hver paraffinform. Den enkelte fisks placering afmærkes ved at anbringe fisk nr. 1 i en vinkel på 180 grader i forhold til fisk nr. 2-4/8.

6. Ekstra paraffin tilsættes for at dække prøven.

7. Formen med kassettebasen anbringes på kryokonsollens køleplade.

8. Når paraffinen er størknet, fjernes blokken (dvs. den hærdede paraffin indeholdende væv og kassettebase) fra formen.

Mikrotomi

Formål:

Skær og anbring histologiske snit til farvning.

Fremgangsmåder:

1. Den første fase af mikrotomien, der kaldes »facing«, udføres som følger:

   a. Paraffinblokken anbringes i mikrotomens kæber.

   b. Kæberne føres frem ved at rotere mikrotomhjulet, og der skæres tykke snit af blokkens paraffinoverflade, indtil kniven når de indlejrede væv.

▼M6

c. Snittykkelsen på mikrotomen sættes til 3-5 mikron. Kæberne føres frem, og der skæres flere snit af blokken for at fjerne eventuelle artefakter, der har dannet sig på vævets snitflade under grovtrimming.

d. Blokken kan fjernes fra kæberne og anbringes med oversiden nedad på isen for at gennemvæde vævet.

2. Den næste fase af mikrotomien er skæring af endeligt snit og montering af vævssnit på objektglas. Disse procedurer udføres som følger:

a. Hvis blokken er blevet sat på is, fjernes blokken fra isen og anbringes igen på mikrotomens kæber.

b. Mikrotomens snittykkelse sættes til 3-5 mikron, og kæberne føres frem ved at dreje mikrotomhjulet. Der skæres snit af blokken, indtil der er frembragt et »bånd« med mindst et acceptabelt snit, der indeholder kønskirtler. (Under delingen kan blokken efter behov fjernes fra kæberne, anbringes på isen for at gennemvæde vævet og sættes tilbage i kæberne igen.)

c. Snittene anbringes fladt flydende på vandoverfladen i vandbadet. Der gøres forsøg på at få mindst et snit, som ikke indeholder folder, og hvor der ikke er opsamlet luftbobler under det.

d. Et mikroskopobjektglas nedsænkes under det bedste snit, som løftes op af vandet ved hjælp af glasset. Denne proces kaldes »montering« af snittet på glasset.

e. Der klargøres tre snit til et sæt fisk. Det andet og tredje snit udtages med intervaller på 50 mikron efter det første snit. Hvis fiskene ikke er indlejret med deres kønskirtler i det samme snitniveau, skal der foretages flere snit for at sikre, at der fås mindst seks snit, der indeholder kønskirtler, fra hver fisk.

f. Med en opmærkningspen til objektglas registreres det bloknummer, glasset blev fremstillet med, på glasset.

g. Glasset anbringes i et farvningsstativ.

h. Blokken fjernes fra kæberne og anbringes med oversiden nedad med henblik på opbevaring.

Farvning, anvendelse af dækglas og glasmærkning

Mål:

— at farve snittene til histopatologisk undersøgelse

— at forsegle monterede og farvede væv permanent

— at identificere farvede snit permanent på en måde, der sikrer fuld sporbarhed.

Fremgangsmåder:

1. Farvning

a. Objektglas lufttørres natten over før farvning.

b. Snittene farves med hematoxylin-eosin.

2. Anvendelse af dækglas

a. Dækglas kan anvendes manuelt eller automatisk.

b. Et objektglas dyppes i xylen eller TissueClear, og overskydende xylen/TissueClear bankes forsigtigt af glasset.

▼**M6**

c. Ca. 0,1 ml monteringsmedium påføres nær enden af objektglasset modsat den matte ende eller på dækglasset.

d. Dækglasset hældes i en lav vinkel, når det lægges på objektglasset.

3. Mærkning

a. Hvert objektglasmærke bør indeholde følgende oplysninger.

i. Laboratoriets navn

ii. Art

iii. Prøvenr./objektglasnr.

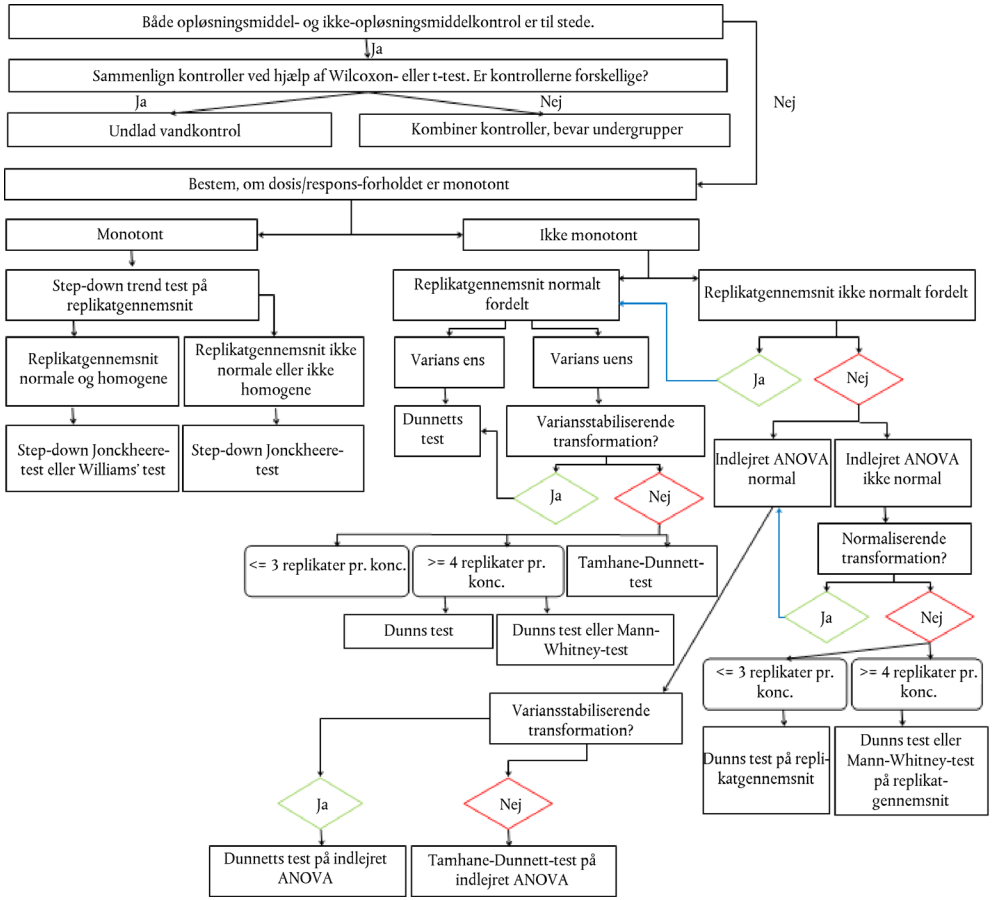
iv. Kemikalie/behandlingsgruppe

v. Dato:

▼M6

Tillæg 8

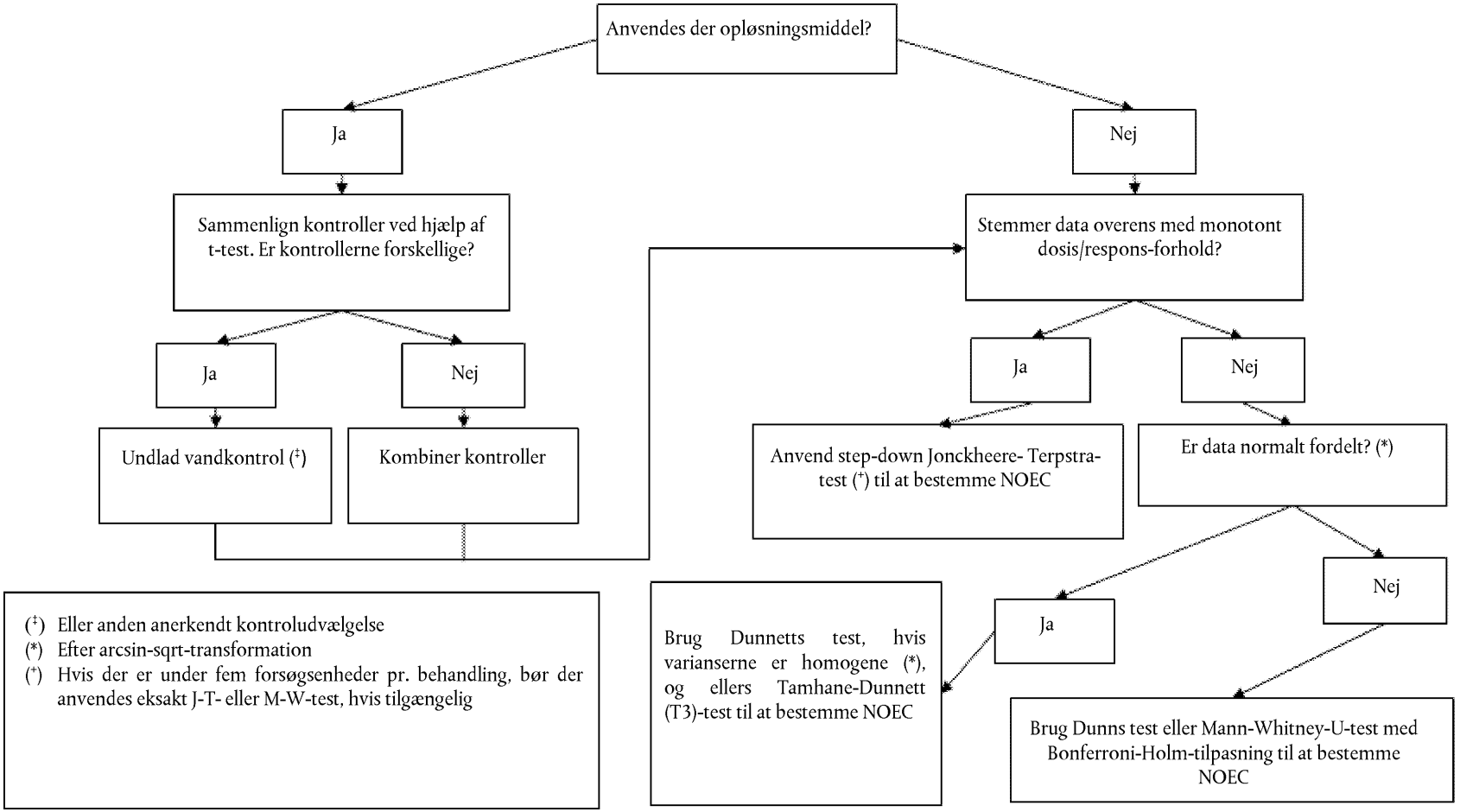
Statistisk flowdiagram for vitellogeninanalyse



02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Statistisk flowdiagram for analyse af kønsfordeling



▼M6

Tillæg 9

Vejledning i udtagning af vævsprøver til genetisk kønsbestemmelse og til genetisk kønsbestemmelse efter PCR-metoden

Udtagning af vævsprøver, klargøring og opbevaring før bestemmelse af genetisk køn efter PCR-metoden hos risfisk (fremstillet af Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG)

1. Med en fin saks klippes gat- eller rygfinne af hver fisk og anbringes i et rør fyldt med 100 µl ekstraktionsbuffer 1 (se oplysninger om fremstilling af buffer nedenfor). Saksen rengøres efter hver fisk i et bæger fyldt med destilleret H_2O og tørres med en papirserviet.

2. Nu homogeniseres finnevævet i et mikrorør med teflonpistil med henblik på lysis af celler. Til hvert rør anvendes en ny pistil for at forebygge eventuel kontaminering. Pistillerne anbringes natten over i 0,5 M NaOH, skylles i fem minutter i destilleret H_2O og opbevares indtil brug i ethanol eller sterilt efter autoklavering.

3. Det er også muligt at opbevare finnevævet uden ekstraktionsbuffer 1 på tøris og siden i fryseskab ved – 80 °C for at forhindre degeneration af DNA. Men ekstraktionen forløber bedre, hvis man ekstraherer DNA samtidig (se ovenfor vedrørende håndtering. Prøver optøs på is efter opbevaring ved – 80 °C, før bufferen fyldes i rørene).

4. Efter homogenisering lægges alle rør i et vandbad og koges i 15 minutter ved 100 °C.

5. Herefter pipetteres 100 µ ekstraktionsbuffer 2 (se nærmere oplysninger om fremstilling af buffer nedenfor) i hvert rør. Prøverne opbevares ved stuetemperatur i 15 minutter, og i mellemtiden rystes de undertiden forsigtigt i hånden.

6. Efterfølgende lægges alle rør i vandbadet igen og koges i endnu 15 minutter ved 100 °C.

7. Indtil videre analyse fryses rørene ved – 20 °C.

Fremstilling af buffer:

PCR-buffer 1:

500 mg N-Lauroylsarcosin (f.eks. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H_2O

→ autoklaveres

PCR-buffer 2:

20 g Chelex (f.eks. Biorad, München, GE)

skal kvælde i 100 ml dest. H_2O

→ autoklaveres

Bestemmelse af genetisk køn (efter PCR-metoden) hos risfisk (fremstillet af Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG og Universität Würzburg Biozentrum)

De klargjorte og frosne rør (beskrevet i ovenstående afsnit) optøs på is. Herefter centrifugeres de under anvendelse af en Eppendorf-centrifuge (30 sekunder ved maksimal hastighed ved stuetemperatur). Til PCR bruges den klare supernatant separeret fra bundfaldet. Det skal absolut undgås, at eventuelle spor af Chelex (lokaliseret i bundfaldet) overføres til PCR-reaktionen, fordi dette vil forstyrre »Taq«-polymeraseaktiviteten. Supernatanten bruges direkte eller kan opbevares frosset (ved – 20 °C) og genoptøs til senere analyser over flere cyklusser uden negativ indvirkning på DNA.

▼**M6**

1. *Fremstilling af »reaktionsblandingen« (25 µl pr. prøve):*

	Mængde	Slutkoncentration
DNA-template	0,5 µl-2 µl	
10 x PCR-buffer med MgCl2	2,5 µl	1x
Nukleotider (hver af dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Fremadrettet primer (10µM) (se nedenfor 3-5)	0,5 µl	200 nM
Bagudrettet primer (10 µM) (se nedenfor 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Vand (PCR-kvalitet)	op til 25 µl	
Taq E- Polymerase	0,3 µl	1,5U
10 x PCR-buffer med $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 ved 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 %Tween 20.		

Til hver PCR (se nedenfor 3-5) er der brug for den særlige primer som en ny kombination af »reaktionsblanding« og den tilstrækkelige nødvendige mængde DNA-template til hver prøve (se ovenfor). De respektive mængder overføres til nye rør ved hjælp af pipetter. Herefter lukkes alle rør, omrøres (ca. 10 sek.) og centrifugeres (10 sek. ved stuetemperatur). Nu kan de respektive PCR-programmer startes. Der benyttes yderligere en positiv kontrol (eksemplarisk DNA-prøve med kendt aktivitet og klare resultater) og en negativ kontrol (1 µl dest. H_2O) i hvert PCR-program.

2. *Fremstilling af agarosegel (1 %) — Under igangværende PCR-programmer:*

— Opløs 3 g agarose i 300 ml 1 × TAE-buffer (1 % agarosegel).

— Denne opløsning koges i en mikrobølgeovn (ca. 2-3 min.).

— Overfør den varme opløsning til en særlig støbningsboks, der ligger på is.

— Efter ca. 20 min. er agarosegelen klar til brug.

— Opbevar agarosegelen i 1 × TAE-buffer indtil afslutningen af PCR-programmerne.

3. *Aktin-PCR-programmet:*

Denne PCR-reaktion har til formål at påvise, at DNA'et i prøven ikke er beskadiget.

— Særlig primer:

»Mact1(øvre/fremadrettet)« → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

»Mact2(nedre/bagudrettet)« → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (35-gange):

Denaturering → 45 sek. ved 95 °C

Annealing → 45 sek. ved 56 °C

Forlængelse → 1 min. ved 68 °C

15 min. 68 °C

▼M6

4. X- og Y-gen-PCR-programmet:

Prøverne med intakt DNA bruges i dette PCR-program til at påvise X- og Y-gener. Hanners DNA bør vise et dobbeltbånd, mens hunners DNA bør vise et enkelt bånd (efter farvning og gelelektroforese). Til denne programafvikling inkluderes en positiv kontrol for hanner (XY-prøver) og en for hunner (XX-prøver).

— Særlig primer:

»PG 17,5« (øvre/fremadrettet) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

»PG 17,6« (nedre/bagudrettet) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (40-gange):

Denaturering	→ 45 sek. ved 95 °C
Annealing	→ 45 sek. ved 55 °C
Forlængelse	→ 1 min. 30 sek. ved 68 °C

15 min. 68 °C

5. Y-gen-PCR-program som »kontrol« for X- og Y-gen-PCR-programmet:

Dette PCR-program kontrollerer resultaterne af »X- og Y-gen-PCR-programmet«. »Hanprøver« bør vise et bånd, mens »hunprøver« bør ikke vise noget bånd (efter farvning og gelelektroforese).

— Særlig primer:

»DMTYa (øvre/fremadrettet)« → GGC CGG GTC CCC GGG TG

»DMTYd (nedre/bagudrettet)« → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. 95 °C

Cyklus (40-gange):

Denaturering	→ 45 sek. ved 95 °C
Annealing	→ 45 sek. ved 56 °C
Forlængelse	→ 1 min. ved 68 °C

15 min. 68 °C

6. Farvning af PCR-prøver:

Farvningsopløsning:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % bromphenolblå

0,25 % xylencyanol

Tilsæt 1 µl farvningsopløsning i hvert enkelt rør ved hjælp af en pipette

7. Påbegyndelse af gelelektroforesen:

— Den fremstillede 1 % agarosegel overføres i et gelelektroforesekammer fyldt med 1 × TAE-buffer

— 10-15 µl af hver farvet PCR-prøve pipetteres i en fordybning i agarosegelen.

— Der pipetteres også 5-15 µl 1kb-»Ladder« (Invitrogen) i en separat fordybning

— Start elektroforesen ved 200 V

— Stop efter 30-45 min.

▼**M6**

8. Bestemmelse af båndene:

— Rens agarosegelen i destilleret H_2O.

— Overfør nu agarosegelen i ethidiumbromid i 15-30 min.

— Tag herefter et billede af agarosegelen i en UV-lysboks.

— Endelig analyseres prøverne sammenlignet med det/de positive kontrolbånd og ladder.

▼M6

Tillæg 10

Vejledning i udtagning af vævsprøver til genetisk kønsbestemmelse efter PCR-metoden hos trepigget hundestejle

Udtagning af vævsprøver og DNA-ekstraktion

DNA kan ekstraheres ved hjælp af en række forskellige reagenser, som er tilgængelige i handlen, og både manuelle og automatiske ekstraktionssystemer. Den protokol, der benyttes ved Cefas Weymouth-laboratoriet, skitseres nedenfor, og de alternative metoder er tilføjet, hvor det er relevant.

1. Med en fin saks fjernes et lille stykke væv (10-20 mg) fra det dorsolaterale område fra hver enkelt fisk (efter at hoved og hale er fjernet til VTG-analyse). Vævet sættes i et rør og placeres enten direkte i flydende kvælstof (til opbevaring ved – 80 °C) eller fyldes med 70 % ethanol (til transport og efterfølgende opbevaring ved 4 °C). Saksen renses efter hver fisk i 70 % ethanol, herefter i destilleret vand og tørres med en papirserviet.

2. Eventuelt ethanol fjernes ved bortsugning, og vævet udrådnes natten over med proteinase K i 400 µl ATL buffer (Qiagen). En delprøve (200 µl) af spaltningsproduktet overføres til en S-blok med 96 brønde (Qiagen), og DNA'et ekstraheres i et format med 96 brønde ved hjælp af Qiagen Universal BioRobot og QIamp Investigator BioRobot kit. DNA'et elueres i 50 µl DNase- og RNasefrit vand. Hvis der anvendes hårdt væv til at ekstrahere DNA (såsom en hvirvelsøjle eller en brystfinne), kan det være nødvendigt at homogenisere prøven i lysisbufferen ved hjælp af en FastPrep® tissue lyser eller tilsvarende vævsnedbrydningssystem.

   Alternativt

   a) Vævet udrådnes natten over med proteinase K i 400 µl G2-lysisbuffer (Qiagen), og DNA'et ekstraheres fra 200 µl af spaltningsproduktet ved hjælp af enten EZ-1 DNA easy tissue kit og EZ-1 biorobot eller DNA easy tissue mini kit. DNA'et elueres i en 50 µl volumen.

   b) Vævene behandles med DNAzol reagens. Vævsprøverne lyseres i 1 ml DNAzol i 10 minutter i et 1,5 ml mikrocentrifugerør og centrifugeres herefter ved 13 000 rpm i 5 minutter for at fjerne eventuelle partikler. Den lyserede prøve overføres herefter til et nyt 1,5 ml mikrocentrifugerør indeholdende 500 µl 100 % ethanol af molekylærbiologisk kvalitet og centrifugeres ved 13 000 rpm i 10 minutter for at udfælde DNA'et. Ethanolen fjernes og erstattes med 400 µl 70 % ethanol af molekylærbiologisk kvalitet, centrifugeres ved 13 000 rpm i 5 minutter, og DNA-pelleten opløses i 50 µl molekylær DNase- og RNasefrit vand. Hvis der anvendes hårdt væv (brystfinne), kan det være nødvendigt at homogenisere prøven i lysisbufferen ved hjælp af en FastPrep® tissue lyser eller tilsvarende vævsnedbrydningssystem forud for ekstraheringen af DNA.

3. DNA'et opbevares ved – 20 °C, indtil det skal bruges.

Vigtigt: der skal bæres handsker under procedurerne.

Analyse af polymerasekædereaktion (PCR)

Der blev udført amplificeringer ved hjælp af 2,5 µl DNA-ekstrakt i et 50 µl reaktionsvolumen under anvendelse af Idh locus-primere (som beskrevet af Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Fremadrettet primer	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Bagudrettet primer	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Der findes mange leverandører af egnede PCR-reagenser. Den nedenfor skitserede metode er den, som i øjeblikket bruges på Cefas Weymouth-laboratoriet.

1. *Fremstilling af »reaktionsblandingen« (50 µl pr. prøve):*

En masterblanding fremstilles på følgende måde: Den kan fremstilles på forhånd og opbevares frossen ved – 20 °C, indtil den skal bruges. Der laves tilstrækkelig masterblanding til en negativ kontrol (kun vand af molekylærbiologisk kvalitet).

	Volumen (stamkonc.)/ prøve	Slutkoncentration
5xGoTaq® Reaction Buffer	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotider (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM hver)	250 µM hver
Fremadrettet primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Bagudrettet primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Vand af molekylærbiologisk kvalitet	30,75 l	
GoTaq polymerase	0,25 µl	1,25U

— Hæld 47,5 µl i et mærket 0,5 ml tyndvægget PCR-rør.

— Tilsæt 2,5 µl oprenset DNA til det korrekt mærkede rør. Gentag for alle prøver og den negative kontrol.

— Dryp to dråber mineralolie i overfladen. Brug alternativt en thermocycler med et opvarmet låg.

— Luk lågene.

— Prøverne blev denatureret i en Peltier PTC-225 thermocycler ved 94 ± 2 °C i 5 minutter efterfulgt af 39 cyklusser ved 94 ± 2 °C i 1 minut, 55 ± 2 °C i 1 minut, 72 ± 2 °C i 1 minut og en endelig forlængelse på 72 ± 2 °C i 10 minutter.

2. *Fremstilling af agarosegel (2 %):*

Traditionelt opløses PCR-produkter på en 20 % agarosegel indeholdende ethidiumbromid.

Kapillarbaserede elektroforesesystemer kan også bruges.

— Afvej 2 g agarose i 100 ml 1 × TAE-buffer.

— Opvarm agarosen i en mikroovn (ca. 2-3 min.), så den opløses.

— Tilsæt 2 dråber ethidiumbromid slutkoncentration 0,5 µg/ml.

— Overfør den varme opløsning til gelstøbningsapparatet.

— Lad gelen hærde.

3. *Gelelektroforese:*

— Overfør agarosegelen til elektroforeseapparatet og nedsænk i 1 × TAE-buffer.

— Hæld 20 µl af hver prøve i en separat brønd og tilsæt en molekylvægtmarkør (100bp DNA ladder, Promega) til en overskydende brønd.

— Elektroforese udføres ved 120 V i 30-45 minutter.

▼**M6**

4. *Visualisering af amplificeringsprodukter*

Hvis ethidiumbromidet blev inkorporeret i agarosegelen som beskrevet ovenfor, visualiseres DNA-produkterne under en UV-kilde. Alternativt farves agarosegelen ved at dække gelen i en fortyndet ethidiumbromidopløsning (0,5 μg/ml i vand) i 30 minutter før visualisering.

▼M6

Tillæg 11

Vejledning i kunstig befrugtning for trepigget hundestejle

Formålet med dette afsnit er at beskrive, ved hvilke fremgangsmåder der kan opnås befrugtede æg fra den trepiggede hundestejle med henblik på at bruge dem i FSDT.

Fremgangsmåder

Udtagning af sperm fra hannerne

1. En han med en god farve fra den ønskede population aflives.

2. Testiklerne fridissekeres fra hver side af fisken. *Testiklerne er normalt stærkt pigmenterede, stavformede strukturer, som let kan ses ved kroppens laterale midterlinje*. Benyt en af følgende metoder:

3. Begynd ved gattet og læg med en fin saks en 1-1,5 cm incision med et enkelt klip i en vinkel på omkring 45 grader.

4. Brug en skalpel til at foretage en lille incision i fiskens side lidt bag pelvis og lige ventralt for de laterale plader.

5. Testiklerne fjernes ved hjælp af en fin pincet og anbringes i en petriskål.

6. Hver testikel dækkes med 100 µl frisklavet **Hank's final solution** (*).

7. Testiklerne skæres i fine terninger med et barberblad eller en skalpel. Dette vil frigøre spermen og give Hank's solution et mælkeagtigt udseende.

8. Væsken, som indeholder sperm, hældes i et rør, idet det tilstræbes ikke at medtage stykker af testikelvæv ved pipetteringen.

9. 800 µl Hank's final solution tilsættes til røret og blandes godt.

10. Om nødvendigt kan hannen præserveres ved fiksering i 100 % ethanol eller andet ønsket fikseringsmiddel. Dette er særligt vigtigt, hvis undersøgelsen udpeger afkommets ophav.

Vigtigt: *Skønt de fleste nødvendige stamopløsninger kan fremstilles i forvejen, skal* ***stamopløsning 5*** *og den efterfølgende* ***slutopløsning*** *være* ***frisklavet*** *på brugsdagen*.

Stamopløsning 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilleret vand (DV)	100 ml
Stamopløsning 2	
Na_2HPO_4 (vandfrit)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DV	100 ml
Stamopløsning 3	
$CaCl_2$	0,72 g
DV	50 ml

(*) Hank's Buffered Salt Solution (HBSS):

HBSS er nødvendig for at præservere spermen, mens befrugtningen forberedes.

▼**M6**

Stamopløsning 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DV	50 ml

Stamopløsning 5 (frisklavet)

$NaHCO_3$	0,35 g
DV	10 ml

Bemærk: Hvis man allerede har nogle af ovennævnte salte, men med et andet vandindhold (dvs. $2H_2O$ i stedet for vandfrit), kan man stadig bruge det, men først justeres vægten baseret på molekylvægt).

Til Hank's final solution kombineres i følgende rækkefølge:

Stamopløsning 1	1,0 ml
Stamopløsning 2	0,1 ml
Stamopløsning 3	0,1 ml
DV	8,6 ml
Stamopløsning 4	0,1 ml
Stamopløsning 5	0,1 ml

Bland godt inden brug.

Befrugtning

1. Store hunner med æg udtages fra den ønskede population. Hunner er først klar til udpresning, når man kan se æg stå frem fra afløbskanalen. Hunner, der er klar, har den karakteristiske holdning med hovedet op.

2. Lad forsigtigt en finger eller tommelfinger løbe langs siden af fisken ned mod halen for at fremme udstødelsen af en ægsæk i en frisk petriskål. Gentag på den anden side og læg fisken tilbage til dens kar.

3. Æggene kan spredes ud (så de danner et lag) ved hjælp af en fin malerpensel. Det er vigtigt at prøve at eksponere så mange æg som muligt for spermen, så det hjælper at gøre overfladearealet så stort som muligt. Vigtigt: Hold æggene fugtige ved at lægge en fugtig serviet omkring dem (det er vigtigt, at æggene ikke rører vand direkte, da dette kan hærde fosterhinden for tidligt og forhindre befrugtning). Der er stor variation i antallet af æg, hver hun kan producere, men i gennemsnit bør der let kunne fås omkring 150 æg fra en enkelt hun med æg.

4. 25 µl sperm i Hank's blanding fordeles jævnt over hele overfladen af æg ved hjælp af en malerpensel. Æggene vil hurtigt hærde og ændre farve (inden for et minut), når befrugtningen er begyndt. Hvis det anslåede antal æg er over 150, gentages proceduren. Tilsvarende tilsættes lidt mere sperm, hvis æggene ikke hærder inden for et minut. Vigtigt: Det forbedrer ikke nødvendigvis befrugtningshastigheden at tilsætte mere sperm.

5. Æggene og spermopløsningen lades »interagere« i mindst 15 minutter, og de befrugtede æg anbringes i eksponeringsakvariet inden for 1,5 time efter befrugtningen.

6. Proceduren gentages med en anden hun, indtil det ønskede antal æg er udtaget.

7. Gem nogle få æg fra det sidste parti og fikser dem i 10 % eddikesyre.

▼M6

Optælling og fordeling af æg i testakvarier

1. Æggene fordeles jævnt mellem hvert behandlingsniveau for at undgå genetisk skævhed. Hvert parti befrugtede æg deles i lige store grupper (så mange, som der er behandlingsniveauer) ved hjælp af et stumpt instrument (dvs. en bredbladet insektpincet eller en inokuleringsløkke). Hvis man sigter efter fire replikater pr. behandling med 20 æg hver, skal der fordeles 80 æg pr. eksponeringsakvarium. Vigtigt: Det anbefales at tilsætte yderligere 20 % (dvs. 96 æg pr. behandlingsniveau), indtil man er sikker på at få 100 % befrugtning.

2. Hundestejleæg er meget modtagelige for svampeinfektioner uden for den rede, faderen bevogter. I den forbindelse er behandling af alle æg med methylenblåt i testens første fem dage helt afgørende. En stamopløsning af methylenblåt fremstilles med 1 mg/ml og tilsættes eksponeringsakvariet for at give en maksimal slutkoncentration på 2,125 mg/l. Vigtigt: Hundestejler må ikke eksponeres for methylenblåt, når de er klækket, så systemet skal derfor være uden methylenblåt senest på dag 6.

3. Æggene inspiceres dagligt, og eventuelt døde eller ubefrugtede æg registreres som sådanne. Vigtigt: Æggene må aldrig være uden for vand, før de klækkes, selv ikke i korte perioder.

▼M6

C.42. BIONEDBRYDELIGHED I HAVVAND

GENEREL INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 306 (1992). Da de oprindelige testmetoder blev udviklet, vidste man ikke, i hvilken grad resultater fra screeningtest for let bionedbrydelighed under anvendelse af ferskvand og spildevand eller aktiveret slam som inokulum kunne anvendes på havmiljøet. Der er registreret forskellige resultater på dette punkt (f.eks. 1)).

2. Meget industrispildevand, som indeholder forskellige kemikalier, når enten havet ved direkte udledning eller via flodmundinger og floder, hvor opholdstiderne er lave sammenlignet med den periode, som er nødvendig for en fuldstændig bionedbrydning af mange af de tilstedeværende kemikalier. På grund af den voksende bevidsthed om behovet for at beskytte havmiljøet mod stigende mængder af kemikalier og behovet for at anslå den sandsynlige kemikaliekoncentration i havet er der udviklet testmetoder for bionedbrydelighed i havvand.

3. De her beskrevne metoder benytter naturligt havvand både som den vandige fase og som kilde til mikroorganismer. I et forsøg på at leve op til metoderne for let bionedbrydelighed i ferskvand blev brugen af ultrafiltreret og centrifugeret havvand undersøgt ligesom brugen af marine sedimenter som inokula. Disse undersøgelser lykkedes ikke. Testmediet er derfor naturligt havvand, som er forbehandlet for at fjerne grove partikler.

4. Med henblik på at vurdere fuldstændig bionedbrydelighed efter rystekolbemetoden skal der anvendes relativt høje koncentrationer af teststoffet, fordi analysemetoden med opløst organisk kulstof (DOC) har en ringe følsomhed. Dette kræver tilsætning af uorganiske næringsstoffer (N og P) til havvandet, idet vandets lave koncentrationer ellers ville begrænse fjernelsen af DOC. Det er også nødvendigt at tilsætte næringsstoffer efter Closed Bottle-metoden på grund af det tilsatte teststofs koncentration.

5. Derfor er metoderne ikke test for let bionedbrydelighed, eftersom der ikke tilsættes inokulum ud over de mikroorganismer, der allerede er til stede i havvandet. Testene simulerer heller ikke havmiljøet, eftersom der tilsættes næringsstoffer, og teststoffets koncentration er langt højere, end man ville finde i havet. Af disse årsager foreslås metoderne under en ny underafdeling »Bionedbrydelighed i havvand«.

ANVENDELSE

6. Testresultaterne, som skulle anvendes, fordi brugsmønstret for og bortskaffelsen af det pågældende stof viste en vej til havet, giver et første indtryk af bionedbrydeligheden i havvand. Hvis resultatet er positivt (> 70 % DOC-fjernelse, > 60 % ThOD — teoretisk iltforbrug), kan det konkluderes, at der er et potentiale for bionedbrydning i havmiljøet. Et negativt resultat udelukker dog ikke et sådant potentiale, men viser, at yderligere undersøgelse er nødvendig, f.eks. ved at bruge en så lav koncentration af teststoffet som muligt.

▼M6

7. Hvis der kræves en mere definitiv værdi for hastigheden eller graden af bionedbrydning i havvand et bestemt sted, vil der i hvert tilfælde skulle anvendes mere komplekse og avancerede og dermed dyrere metoder. F.eks. kunne der anvendes en simuleringstest med en koncentration af teststoffet, som ligger tættere på den sandsynlige koncentration i miljøet. Der kunne også bruges ikkeberiget og ikkeforbehandlet havvand fra det interessante sted, og primær bionedbrydning kunne følges op af en specifik kemisk analyse. For fuldstændig bionedbrydelighed ville ^{14}C-mærkede stoffer være nødvendige, for at forsvindingshastigheden for opløselig organisk ^{14}C og produktionen af $^{14}CO_2$ ved miljømæssigt realistiske koncentrationer kunne måles.

VALG AF METODER

8. Hvilke metoder der skal bruges, afhænger af en række faktorer. Følgende tabel giver hjælp til at vælge. Selv om stoffer med en vandopløselighed under det, der svarer til omkring 5 mg C/l, ikke kan testes efter rystekolbemetoden, kan tungt opløselige stoffer — i hvert fald i princippet — testes efter Closed Bottle-metoden.

Tabel

Fordele og ulemper ved rystekolbetest og closed bottle-test

METODE	FORDELE	ULEMPER
RYSTEKOLBE	— enkelt apparat undtagen kulstofanalysator — 60 dages varighed er ikke noget problem — ingen forstyrrende nitrifikation — kan tilpasses flygtige stoffer	— kræver kulstofanalysator — bruger 5-40 mg DOC/1, kunne være hæmmende — DOC-bestemmelse er vanskelig ved lave koncentrationer i havvand (chlorideffekt) — DOC er undertiden høj i havvand
CLOSED BOTTLE	— enkelt apparat — enkel slutbestemmelse — bruger lav koncentration af teststof (2 mg/l) og således mindre sandsynlighed for inhibering — kan let tilpasses flygtige stoffer	— kunne være vanskeligt at opretholde flaskernes lufttæthed — bakterievækst på væggen kan føre til falske værdier — rene O_2-optagelsesværdier kan være høje, især efter 28 dage; kan løses ved ældning af havvandet — mulig forstyrrelse fra O_2-optagelse ved nitrifikation

RYSTEKOLBEMETODEN

INDLEDNING

1. Denne metode er en havvandsvariant af den modificerede OECD-screeningtest, der er beskrevet i kapitel C.4B i dette bilag (2). Den blev færdiggjort som resultat af en ringtest afholdt for Europa-Kommissionen af Vandkvalitetsinstituttet (3).

2. I lighed med den tilhørende marine closed bottle-metode skal resultaterne fra denne test ikke opfattes som indikatorer for let bionedbrydelighed, men skal bruges specifikt til at opnå information om stoffers bionedbrydelighed i havmiljøer.

▼M6

METODENS PRINCIP

3. En på forhånd fastsat mængde teststof opløses i testmediet for at få en koncentration på 5-40 mg opløst organisk kulstof (DOC)/l. Hvis organiske kulstofanalysers følsomhedsgrænser forbedres, kan brugen af lavere koncentrationer af teststof være en fordel, især for inhibitoriske stoffer. Opløsningen af teststoffet i testmediet inkuberes under omrøring i mørke eller i diffus belysning under aerobe betingelser ved en fast temperatur (kontrolleret til ± 2 °C), som normalt ligger inden for intervallet 15-20 °C. I tilfælde, hvor undersøgelsens formål er at simulere situationer i miljøet, kan testene udføres over dette normale temperaturområde. Den anbefalede maksimale testvarighed er ca. 60 dage. Nedbrydning efterfølges af DOC-målinger (fuldstændig nedbrydning) og — i nogle tilfælde — af specifik analyse (primær nedbrydning).

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

4. For at vide, om testen kan anvendes på et bestemt stof, skal nogle af dets egenskaber være kendt. Stoffets organiske kulstofindhold skal fastslås, dets flygtighed skal være således, at der ikke opstår betydelige tab i løbet af testen, og dets vandopløselighed bør være større, end hvad der svarer til 25-40 mg C/l. Teststoffet må heller ikke i væsentlig grad adsorbere til glasoverflader. Oplysninger om teststoffets renhed eller forholdet mellem dets hovedbestanddele er nødvendige for, at de fundne resultater kan fortolkes, især hvis de ligger tæt på tærskelværdien.

5. Oplysninger om teststoffets toksicitet over for bakterier, f.eks. som målt i kortvarige respirationshastighedstest (4), kan være nyttige ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning. Sådanne oplysninger er dog ikke altid tilstrækkelige til at fortolke de resultater, der fås i bionedbrydningstesten, og proceduren, som er beskrevet i punkt 18, er mere egnet.

REFERENCESTOFFER

6. Egnede referencestoffer skal bruges til at kontrollere den mikrobielle aktivitet i havvandsprøven. Natriumbenzoat, natriumacetat and anilin er eksempler på stoffer, der kan bruges til dette formål. Referencestofferne skal nedbrydes inden for et rimeligt kort tidsrum, ellers anbefales det, at testen gentages under anvendelse af en anden havvandsprøve.

7. I Europa-Kommissionens ringtest, hvor der blev udtaget havvandsprøver forskellige steder og på forskellige tidspunkter på året (3), var lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % nedbrydning (t_{50}), eksklusive lag-fasen, henholdsvis 1-4 dage og 1-7 dage for natriumbenzoat. For anilin varede t_L fra 0 til 10 dage, mens t_{50} varede fra 1 til 10 dage.

METODENS REPRODUCERBARHED OG FØLSOMHED

8. Metodens reproducerbarhed blev fastslået i ringtesten (3). Den laveste teststofkoncentration, for hvilken denne metode kan bruges med DOC-analyse, bestemmes i vid udstrækning af detektionsgrænsen for den organiske kulstofanalyse (omkring 0,5 mg C/l) og den anvendte koncentration af opløst organisk kulstof i havvandet (normalt i størrelsesordenen 3-5 mg/l for vand fra åbent hav). Baggrundskoncentrationen for DOC må ikke overstige omkring 20 % af den samlede DOC-koncentration efter tilsætning af teststoffet. Hvis dette ikke kan lade sig gøre, kan baggrundskoncentrationen

▼M6

undertiden reduceres ved at ælde havvandet før testning. Bruges metoden kun med en specifik kemisk analyse (hvorved der måles primær nedbrydning), skal forsøgslederen ved at fremlægge yderligere oplysninger dokumentere, om fuldstændig nedbrydelighed kan forventes. Disse supplerende oplysninger kan bestå af resultater fra andre test for let eller naturlig bionedbrydelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparater

9. Sædvanligt laboratorieudstyr og:

   a. rysteapparat beregnet til 0,5-2 liter Erlenmeyerkolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller brugt i et rum med konstant temperatur ved 15-20 °C kontrolleret til ± 2 °C

   b. Erlenmeyerkolber med smal hals, 0,5-2 liter

   c. apparatur til membranfiltrering eller centrifuge

   d. membranfiltre, 0,2-0,45 μm;

   e. kulstofanalysator

   f. udstyr til specifik analyse (valgfrit).

Havvand

10. Opsaml en prøve af havvand i en grundigt rengjort beholder, og transporter den til laboratoriet, helst inden for 1-2 dage efter opsamlingen. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end forsøgstemperaturen. Identificer prøvetagningsstedet nøjagtigt og beskriv det med hensyn til forurenings- og næringsmæssig status. Især for kystvand medtages i denne karakterisering et heterotroft kimtal og bestemmelse af koncentrationerne af opløst nitrat, ammonium og fosfat.

11. Oplys følgende om selve havvandet:

   — prøvetagningsdato

   — prøvetagningsdybde

   — prøvens udseende — uklar osv.

   — temperatur på opsamlingstidspunktet

   — saltindhold

   — DOC

   — frist mellem prøvetagning og brug i testen.

12. Hvis det konstateres, at DOC-indholdet i havvandsprøven er højt (punkt 8), anbefales det, at havvandet ældes i ca. en uge før brug. Ældning ved opbevaring under aerobe betingelser ved testtemperatur og i mørke eller diffus belysning. Oprethold om nødvendigt aerobe betingelser ved forsigtig beluftning. Under ældning reduceres indholdet af let nedbrydeligt organisk materiale. I

▼M6

ringtesten (3) blev der ikke påvist forskel mellem ældede og frisk opsamlede havvandsprøvers nedbrydningspotentiale. Inden brug forbehandles havvandet for at fjerne grove partikler, f.eks. ved filtrering gennem et nylonfilter eller groft papirfilter (ikke membran- eller GF-C-filtre) eller ved sedimentering og dekantering. Den anvendte fremgangsmåde skal registreres. Foretag forbehandling efter eventuel ældning.

Stamopløsninger til uorganiske næringsstoffer

13. Fremstil følgende stamopløsninger ud fra reagenser af analysekvalitet:

a)	Kaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumdihydrogenorthophosphat, K_2HPO4	21,75 g
	Dinatriumhydrogenorthophosphatdihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
b)	Calciumchlorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
c)	Magnesiumsulfatheptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
d)	Jern(III)chloridhexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	

Udfældning i opløsning d) kan forebygges ved at tilsætte en dråbe koncentreret HCl eller 0,4 g ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA, dinatriumsalt) pr. liter. Hvis der dannes bundfald i en stamopløsning, udskiftes den med en frisklavet opløsning.

Fremstilling af testmedium

14. Tilsæt 1 ml af hver af de ovennævnte stamopløsninger pr. liter forbehandlet havvand.

Inokulum

15. Tilsæt ikke et specifikt inokulum ud over de mikroorganismer, som allerede er til stede i havvandet. Bestem (valgfrit) antallet af kolonidannende heterotrofer i havvandstestmediet (og helst også i de oprindelige havvandsprøver), f.eks. ved pladetælling ved hjælp af marin agar. Dette er specielt ønskeligt for prøver fra kystområder eller forurenede steder. Kontroller den heterotrofe mikrobielle aktivitet i havvandet ved at foretage en test med referencestoffet.

▼M6

Klargøring af kolber

16. Sørg for, at alt glasudstyr er pinligt rent, ikke nødvendigvis sterilt (f.eks. ved at bruge alkoholisk saltsyre), skyllet og tørret før brug for at undgå forurening med restprodukter fra tidligere test. Kolberne skal også rengøres før første brug.

17. Vurder teststoffer i to kolber samtidig sammen med en enkelt kolbe til referencestoffet. Foretag en dobbelt blindtest uden hverken test- eller referencestof for at bestemme analytiske blindheder. Opløs teststofferne i testmediet — de kan med fordel tilsættes via en koncentreret stamopløsning — for at give de ønskede startkoncentrationer på normalt 5-40 mg DOC/l. Test referencestoffet på normal vis ved en startkoncentration svarende til 20 mg DOC/l. Hvis der anvendes stamopløsninger af test- og/eller referencestoffer, skal det sikres, at saltindholdet af havvandsmediet ikke ændres væsentligt.

18. Hvis der kan forventes toksiske virkninger, eller hvis de ikke kan udelukkes, kan det være tilrådeligt at inkludere et dobbelt inhiberingsforsøg i testdesignet. Tilsæt test- og referencestoffer i den samme beholder, idet referencestoffets koncentration normalt skal være den samme som i kontroltesten (dvs. 20 mg DOC/l) med henblik på sammenligning.

19. Fordel passende mængder testopløsninger i Erlenmeyerkolber (op til omkring halvdelen af kolbens volumen er en passende mængde), og dæk hver kolbe løst (med f.eks. aluminiumsfolie), som muliggør gasudveksling mellem kolben og den omgivende luft. (Vatpropper er uegnede, hvis der benyttes DOC-analyse). Anbring beholderne på rysteapparatet og ryst kontinuerligt ved en forsigtig hastighed (f.eks. 100 rpm) under testen. Kontroller temperaturen (15-20 °C og inden for ± 2 °C), og beskyt beholderne mod lys for at undgå algevækst. Sørg for, at luften er fri for toksiske materialer.

Fysisk-kemisk kontroltest (valgfri)

20. Hvis der er mistanke om abiotisk nedbrydning eller tabsmekanismer, såsom hydrolyse (kun et problem med specifik analyse), fordampning eller adsorption, anbefales det at foretage et fysisk-kemisk kontrolforsøg. Dette kan gøres ved at tilsætte kviksølv(II)chlorid ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) til beholdere med teststof for at standse mikrobiel aktivitet. Et signifikant fald i DOC eller specifik stofkoncentration i den fysisk-kemiske kontroltest viser abiotiske fjernelsesmekanismer. (Hvis der bruges kviksølvchlorid, bør der fokuseres på indvirkninger eller katalysatorforgiftning i DOC-analysen.)

Antal kolber

21. I en typisk testrække anvendes følgende kolber:

Kolbe 1 og 2	indeholder teststof (testsuspension)
Kolbe 3 og 4	indeholder kun havvand (blind)
Kolbe 5	indeholder referencestof (procedurekontrol)
Kolbe 6	indeholder test- og referencestof (toksicitetskontrol) — valgfri
Kolbe 7	indeholder teststof og steriliserende stof (abiotisk steril kontrol) — valgfri

([1]) Kviksølv(II)chlorid ($HgCl_2$) er et meget giftigt stof, som skal håndteres efter passende sikkerhedsforholdsregler. Væskeformigt affald, der indeholder dette kemikalie, skal bortskaffes på behørig vis og må ikke udledes i spildevandssystemet.

▼M6

DOC-analyse

22. Udtag prøver til DOC-analyse med passende intervaller i løbet af testen (tillæg 1). Udtag altid prøver ved testens begyndelse (dag 0) og på dag 60. Mindst fem prøver i alt er nødvendige for at beskrive nedbrydningens tidsforløb. En fast tidsplan for prøvetagningen kan ikke angives, da bionedbrydningshastigheden varierer. Udfør dobbeltbestemmelse af DOC på hver prøve.

Prøveudtagning

23. Den nødvendige mængde prøver afhænger af analysemetoden (specifik analyse), af den anvendte kulstofanalysator og af fremgangsmåden (membranfiltrering eller centrifugering), der er valgt til prøvebehandling før kulstofbestemmelsen (punkt 25 og 26). Før prøveudtagningen sikres det, at testmediet er blandet godt, og at materiale, der eventuelt sidder fast på kolbens sider, er opløst eller opslæmmet.

24. Membranfiltrer eller centrifuger umiddelbart efter prøveudtagningen. Opbevar om nødvendigt de filtrerede eller centrifugerede prøver ved 2-4 °C i op til 48 timer eller ved under – 18 °C i længere perioder (hvis det er kendt, at stoffet forbliver upåvirket, foretages forsuring til pH 2 før opbevaring).

25. Membranfiltre (0,2-0,45 μm) er egnede, hvis det sikres, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen, f.eks. polycarbonatmembranfiltre. Nogle membranfiltre er behandlet med overfladeaktive stoffer, så de bliver mere hydrofile og kan udlede betydelige mængder opløst kulstof. Klargør disse filtre ved at koge dem i deioniseret vand i tre på hinanden følgende perioder à en time. Efter kogning opbevares filtrene i deioniseret vand. De første 20 ml af filtratet kasseres.

26. Centrifugering af prøverne kan vælges som alternativ til membranfiltrering. Centrifuger ved 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) i 15 minutter, helst i en afkølet centrifuge.

Bemærk: Differentiering af det totale organiske kulstofindhold (TOC) i forhold til DOC (TOC/DOC) ved centrifugering ser ikke ud til at fungere ved meget lave koncentrationer, da enten ikke alle bakterier fjernes, eller noget af kulstoffet i bakteriernes cytoplasma genopløses. Ved højere testkoncentrationer (> 10 mg C pr. liter) ser centrifugeringsfejlen ud til at være forholdsvis lille.

Prøveudtagningsfrekvens

27. Hvis der foretages analyser umiddelbart efter prøveudtagning, vurderes det næste prøveudtagningstidspunkt ved at se på resultatet af den analytiske bestemmelse.

28. Hvis der opbevares prøver (punkt 24) til analyse på et senere tidspunkt, udtages flere prøver end det krævede minimumsantal på fem. Analyser de sidste prøver først, og gennem et trinvist »bagudrettet« valg af egnede prøver til analyse er det muligt at få en god beskrivelse af bionedbrydningskurven med et relativt lavt antal analytiske bestemmelser. Har der ikke fundet nogen nedbrydning sted ved testens afslutning, behøver der ikke blive analyseret yderligere prøver, og i denne situation kan den »bagudrettede« strategi spare betydelige omkostninger til analyse.

▼M6

29. Hvis der observeres et plateau på nedbrydningskurven før dag 60, afsluttes testen. Hvis nedbrydningen tydeligvis er startet senest på dag 60, men ikke har nået et plateau, udvides forsøget i en periode mere.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

30. Registrer analyseresultaterne på det vedføjede resultatskema (tillæg 2) og beregn bionedbrydningsværdierne for både test- og referencestoffer ud fra ligningen:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

hvor:

D_t = nedbrydning i procent DOC eller specifik stoffjernelse på tidspunkt t,

C_o = startkoncentration af DOC eller specifikt stof i testmediet

C_t = koncentration af DOC eller specifikt stof i testmediet på tidspunkt t

$C_{bl(0)}$ = startkoncentration af DOC eller specifikt stof i blindtesten

$C_{bl(t)}$ = koncentration af DOC eller specifikt stof i blindtesten på tidspunkt t.

31. Angiv nedbrydning som procent DOC-fjernelse (fuldstændig nedbrydning) eller specifik stoffjernelse (primær nedbrydning) på tidspunkt t. Beregn DOC-koncentrationer til nærmeste 0,1 mg pr. liter, og rund gennemsnit af D_t-værdier op til nærmeste hele procent.

32. Illustrer nedbrydningsforløbet grafisk i et diagram som vist i figuren i »Validitet og fortolkning af resultater«. Hvis der er tilstrækkelige data, beregnes lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % fjernelse fra afslutningen af lag-fasen (t_{50}) på grundlag af kurven.

Testrapport

33. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata.

Testbetingelser:

— beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet, herunder forurenings- og næringsmæssig status (kimtal, nitrat, ammonium og eventuelt fosfat)

— prøvens karakteristika (dato for prøvetagning, dybde, udseende, temperatur, saltindhold, DOC (valgfrit), frist mellem opsamling og brug i testen

▼M6

— (eventuelt) anvendt metode til ældning af havvandet

— anvendt metode til forbehandling (filtrering/sedimentering) af havvandet

— angivelse af den anvendte metode til DOC-bestemmelse

— anvendt metode til specifik analyse (valgfrit)

— anvendt metode til bestemmelse af antallet af heterotrofer i havvandet (pladetællingsmetode eller alternativ fremgangsmåde) (valgfrit)

— andre anvendte metoder (valgfrit) til at karakterisere havvandet (ATP-målinger osv.).

Resultater:

— analysedata registreret på et resultatskema (tillæg 2)

— forløbet af nedbrydningstesten grafisk fremstillet i et diagram, som viser lag-fase (t_L), hældning og tid (med start fra afslutningen af lag-fasen) til at nå 50 % fjernelse (t_{50}). Lag-fasen kan anslås grafisk som vist i figuren i afsnittet »Validitet og fortolkning af resultater« eller kan med fordel tages som den tid, det kræver at nå 10 % nedbrydning

— procent nedbrydning målt efter 60 dage eller ved testens afslutning.

Diskussion af resultaterne

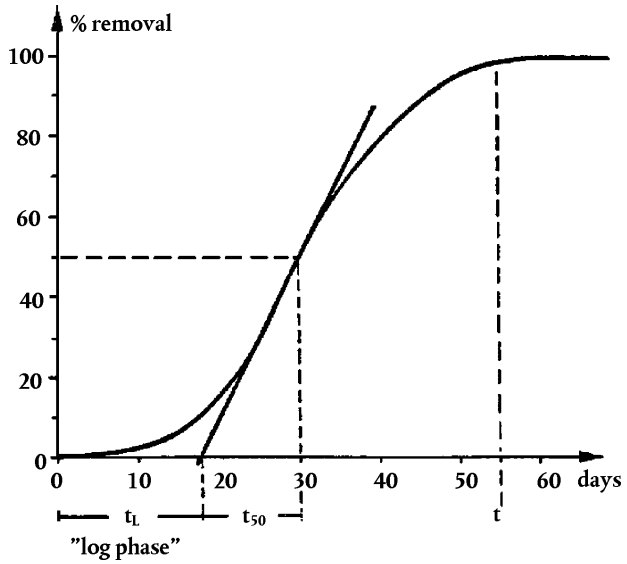
Validitet og fortolkning af resultater

34. De resultater, der opnås med referencestoffer, f.eks. natriumbenzoat, natriumacetat and anilin, bør være sammenlignelige med resultater opnået i ringtesten (3) (se afsnittet »Referencestoffer«, punkt 7). Hvis de resultater, som opnås med referencestoffer, er atypiske, gentages testen med en anden havvandsprøve. Skønt det måske ikke altid er lige enkelt at fortolke resultaterne af inhiberingstest på grund af teststoffets DOC-bidrag, er en væsentlig reduktion af den samlede DOC-fjernelseshastighed sammenlignet med kontrollen et positivt tegn på toksiske virkninger.

35. På grund af de relativt høje testkoncentrationer, der anvendes sammenlignet med de fleste naturlige systemer (og som følge heraf et ugunstigt forhold mellem koncentrationer af teststoffer og andre kulstofkilder), skal metoden betragtes som en foreløbig test, der kan bruges til at vise, om et stof er let bionedbrydeligt eller ej. I overensstemmelse hermed betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt i havmiljøer, men viser, at det kræver mere arbejde, hvis det skal fastslås.

Et eksempel på et teoretisk nedbrydningsforsøg, som illustrerer en gennemførlig måde, hvorpå man kan anslå de værdier for t_L (»lag-fasens« længde) og t_{50} (tidsinterval, der starter ved t_L), som er nødvendige for at nå 50 % fjernelse, er anført i nedenstående figur.

▼M6



CLOSED BOTTLE-METODEN

INDLEDNING

1. Denne metode er en havvandsvariant af closed bottle-testen (5) og blev afsluttet som resultat af en ringtest afholdt for Europa-Kommissionen af Vandkvalitetsinstituttet (3).

2. I lighed med den tilknyttede marine rystekolbemetode skal resultaterne af denne test ikke opfattes som tegn på let bionedbrydelighed, men skal bruges specifikt til at opnå information om stoffers bionedbrydelighed i havmiljøer.

METODENS PRINCIP

3. En forud fastsat mængde teststof opløses i testmediet i en koncentration på normalt 2-10 mg af teststoffet pr. liter (en eller flere koncentrationer kan bruges). Opløsningen opbevares i en fyldt lukket kolbe i mørke i et konstant temperaturbad eller -kammer, som holdes på ± 1 °C inden for et interval på 15-20 °C. I de tilfælde, hvor undersøgelsens formål er at simulere situationer i miljøet, kan testene udføres over dette normale temperaturområde, forudsat at der foretages passende justeringer af temperaturstyringen. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved iltanalyse.

4. Ringtesten viste, at hvis testen blev forlænget ud over 28 dage, kunne der i de fleste tilfælde ikke indsamles nyttig information på grund af alvorlige forstyrrelser. Blindværdierne for biologisk iltforbrug (BOD) var særdeles høje, formentlig på grund af vægvækst forårsaget af manglende omrøring og nitrifikation. Den anbefalede varighed er således 28 dage, men hvis blindværdien for BOD forbliver inden for 30 %-grænsen (punkt 15 og 40), kan testen forlænges.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

5. For at vide, om testen kan anvendes på et bestemt stof, skal nogle af dets egenskaber være kendt. Den empiriske formel er nødvendig, således at det teoretiske iltforbrug (ThOD) kan beregnes (se tillæg 3), ellers skal stoffets kemiske iltforbrug (COD) bestemmes, så det kan bruges som referenceværdi. Brugen af COD er mindre tilfredsstillende, eftersom nogle af stofferne ikke iltes fuldstændigt i COD-testen.

▼M6

6. Stoffets opløselighed bør være mindst 2 mg/l, om end mindre opløselige stoffer og også flygtige stoffer i princippet kunne testes (f.eks. ved hjælp af ultralydbehandling). Oplysninger om teststoffets renhed eller forholdet mellem dets hovedbestanddele er nødvendige for, at de fundne resultater kan fortolkes, især hvis de ligger tæt på tærskelværdien.

7. Oplysninger om stoffets toksicitet over for bakterier, f.eks. som målt i kortvarige respirationshastighedstest (4), kan være til nytte ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for en korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning. Sådanne oplysninger er dog ikke altid tilstrækkelige til at fortolke de resultater, der fås i bionedbrydningstesten, og fremgangsmåden, som er beskrevet i punkt 27, er mere egnet.

REFERENCESTOFFER

8. Egnede referencestoffer skal bruges til at kontrollere den mikrobielle aktivitet i havvandsprøven. F.eks. kan anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat bruges til dette formål. Disse stoffer på mindst 60 % (af deres ThOD) skal nedbrydes inden for et rimeligt kort tidsrum, ellers anbefales det, at testen gentages under anvendelse af en anden havvandsprøve.

9. I Europa-Kommissionens ringtest, hvor der blev udtaget havvandsprøver forskellige steder og på forskellige tidspunkter på året, var lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % nedbrydning (t_{50}) eksklusive lag-fasen, henholdsvis 0-2 dage og 1-4 dage for natriumbenzoat. For anilin var t_L- og t_{50}-værdierne henholdsvis 0-7 og 2-12 dage.

REPRODUCERBARHED

10. Metodernes reproducerbarhed blev fastslået i Europa-Kommissionens ringtest (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparater

11. Sædvanligt laboratorieudstyr og:

a) 250-300 ml BOD-kolber med glasprop eller 250 ml kolbe med smal hals og glaslåg kan anvendes

b) flere kolber (2-3-4 l) med litermærker til forberedelse af forsøget og til opfyldning af BOD-kolberne

c) vandbad eller kammer med konstant temperatur til opbevaring af kolberne ved konstant temperatur (± 1 °C) i mørke

d) udstyr til analyse af opløst ilt

e) membranfiltre, 0,2-0,45 μm (valgfrit)

(f) udstyr til specifik analyse (valgfrit).

Havvand

12. Opsaml en prøve af havvand i en grundigt rengjort beholder, og transporter den til laboratoriet, helst inden for 1-2 dage efter opsamlingen. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end testtemperaturen.

▼**M6**

13. Identificer prøvetagningsstedet nøjagtigt, og beskriv det med hensyn til forurenings- og næringsstatus. Især for kystvand og forurenet farvand medtages i denne karakterisering et heterotroft kimtal og bestemmelse af koncentrationer af opløst nitrat, ammonium og fosfat.

14. Oplys følgende om selve havvandet:

— prøvetagningsdato

— prøvetagningsdybde

— prøvens udseende — uklarhed osv.

— temperatur på opsamlingstidspunktet

— saltindhold

— opløst organisk kulstof (DOC)

— frist mellem prøvetagning og brug i testen.

15. Såfremt det konstateres, at prøvens DOC-indhold er højt, eller hvis man mener, at blindværdien for BOD efter 28 dage vil være højere end 30 % af referencekemikaliernes, anbefales det, at havvandet ældes i ca. en uge før brug.

16. Æld prøven ved opbevaring under aerobe betingelser ved testtemperatur og i mørke eller diffus belysning. Oprethold om nødvendigt aerobe betingelser ved forsigtig beluftning. Under ældning reduceres indholdet af let nedbrydeligt organisk materiale. I ringtesten (3) blev der ikke påvist forskel mellem ældede og frisk opsamlede havvandsprøvers nedbrydningspotentiale.

17. Inden brug forbehandles havvandet for at fjerne grove partikler, f.eks. ved filtrering gennem et nylonfilter eller groft papirfilter (ikke membran- eller GF-C-filtre) eller ved sedimentering og dekantering. Registrer den anvendte fremgangsmåde. Forbehandl eventuelt efter ældning.

Stamopløsninger til uorganiske næringsstoffer

18. Fremstil følgende stamopløsninger ud fra reagenser af analysekvalitet:

a)	Kaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumhydrogenorthophosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumhydrogenorthophosphatdihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
b)	Calciumchlorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
c)	Magnesiumsulfatheptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	
d)	Jern(III)chloridhexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Opløs i destilleret vand, og fortynd til 1 liter	

▼M6

Udfældning i opløsning d) kan forebygges ved at tilsætte en dråbe koncentreret HCl eller 0,4 g ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA, dinatriumsalt) pr. liter. Hvis der dannes bundfald i en stamopløsning, udskiftes den med en frisklavet opløsning.

Fremstilling af testmedium

19. Tilsæt 1 ml af hver af de ovennævnte stamopløsninger pr. liter forbehandlet havvand. Mæt testmediet med luft ved testtemperaturen ved at belufte med ren komprimeret luft i omkring 20 minutter. Som kontrol bestemmes koncentrationen af opløst ilt. Denne mættede koncentration af opløst ilt som funktion af saltindhold og temperatur kan aflæses af det nomogram, der er vedføjet denne testmetode (tillæg 4).

Inokulum

20. Tilsæt ikke et specifikt inokulum ud over de mikroorganismer, som allerede er til stede i havvandet. Bestem (valgfrit) antallet af kolonidannende heterotrofer i havvandstestmediet (og helst også i den oprindelige havvandsprøve), f.eks. ved pladetælling ved hjælp af en marin agar. Dette er specielt ønskeligt for prøver fra kystområder eller forurenede steder. Kontroller den heterotrofe mikrobielle aktivitet i havvandet ved at foretage en test med referencestoffet.

Klargøring af testkolber

21. Udfør alle nødvendige modifikationer, bl.a. ældning og forbehandling af havvandet ved den valgte testtemperatur på 15-20 °C, idet alt glasudstyr skal være rengjort, men ikke sterilt.

22. Klargør parallelle grupper af BOD-kolber til samtidige forsøg med bestemmelse af BOD i test- og referencestoffer. Foretag alle analyser på to kolber (blind-, reference- og teststoffer), dvs. klargør to kolber til hver bestemmelse. Foretag som minimum analyser på dag 0, 5, 15 og 28 (fire bestemmelser). Til iltanalyser kræver fire bestemmelser i alt $3 \times 2 \times 4 = 24$ kolber (blind-, reference- og teststof) og således omkring 8 liter testmedium (til en koncentration af teststoffet).

23. Fremstil separate opløsninger af test- og referencestoffer i store kolber med tilstrækkeligt volumen (punkt 11) ved først at tilsætte test- og referencestoffer enten direkte eller ved at benytte en koncentreret stamopløsning til delvist fyldte store kolber. Tilsæt yderligere testmedium for at opnå de ønskede slutkoncentrationer. Hvis der anvendes stamopløsninger af test- og/eller referencestoffer, skal det sikres, at saltindholdet af havvandsmediet ikke ændres væsentligt.

24. Vælg koncentrationer af test- og referencestoffer ved at tage følgende i betragtning:

a) opløseligheden af opløst ilt i havvand ved den givne testtemperatur og det givne saltindhold (se vedføjede nomogram — tillæg 4)

b) blindværdien af BOD i havvandet og

c) teststoffets forventede bionedbrydelighed.

▼M6

25. Ved 15 °C og 20 °C og et saltindhold på 32 promille (havvand) ligger opløseligheden af opløst ilt på omkring henholdsvis 8,1 og 7,4 mg/l. Selve havvandets iltforbrug (respiration i en blindkontrol) kan være 2 mg O_2/l eller derover, hvis havvandet ikke er ældet. For at sikre, at der er en signifikant iltkoncentration tilbage efter iltning af teststoffet, bruges der derfor en start-koncentration af teststoffet på omkring 2-3 mg/l (afhængigt af ThOD) for de stoffer, som forventes at blive helt nedbrudt under testbetingelserne (såsom referencestoffer). Test mindre nedbrydelige stoffer ved højere koncentrationer, op til ca. 10 mg/l, forudsat at der ikke forekommer toksiske virkninger. Det kan være en fordel at foretage parallelle test med en lav (ca. 2 mg/l) og en høj (ca. 10 mg/l) koncentration af teststoffet.

26. Der skal sideløbende bestemmes en ren værdi for ilt i kolber, som hverken indeholder test- eller referencestof.

27. Hvis der skal bestemmes inhibitoriske virkninger, klargøres følgende serie opløsninger i separate store kolber (punkt 13):

a) 2 mg pr. liter af et letnedbrydeligt stof, f.eks. et af de nævnte reference-stoffer

b) x mg pr. liter teststof (x er normalt 2)

c) 2 mg pr. liter af det letnedbrydelige stof plus x mg pr. liter teststof

Fysisk-kemisk kontroltest (valgfri)

28. Hvis muligheden for at bruge specifikke analyser benyttes, kan der foretages en fysisk-kemisk test for at kontrollere, om teststoffet fjernes ved abiotiske mekanismer, såsom hydrolyse eller adsorption. En fysisk-kemisk kontroltest kan foretages ved at tilsætte kviksølv(II)chlorid ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) til to kolber med teststof med henblik på at standse mikrobiel aktivitet. Et signifikant fald i specifik stofkoncentration i løbet af testen viser abiotiske fjernelsesmekanismer.

Antal BOD-kolber i en typisk testrække

29. I en typisk testrække anvendes følgende antal kolber:

— mindst 8, som indeholder teststof

— mindst 8, som kun indeholder næringsberiget havvand

— mindst 8, som indeholder referencestof, og når det er nødvendigt

— 6 kolber, som indeholder test- og referencestoffer (toksicitetskontrol).

FREMGANGSMÅDE

30. Efter klargøringen opsuges straks hver opløsning fra den nederste fjerdedel (ikke fra bunden) af den relevante store kolbe for at fylde den respektive gruppe af BOD-kolber. Analyser straks nulkontrollerne (tid nul) for opløst ilt (punkt 33) eller opbevar dem til senere kemisk analyse ved udfældning med $MnCl_2$ (mangan(II)chlorid) og NaOH (natriumhydroxid).

([1]) Kviksølv(II)chlorid ($HgCl_2$) er et meget giftigt stof, som skal håndteres efter passende sikkerhedsforholdsregler. Væskeformigt affald, der indeholder dette kemikalie, skal bort-skaffes på behørig vis og må ikke udledes direkte i spildevandssystemet.

▼M6

31. Inkuber de resterende parallelle BOD-kolber ved testtemperatur (15-20 °C), opbevar i mørke og fjern fra inkubationsområdet med passende tidsintervaller (f.eks. efter 5, 15 og 28 dage som minimum) og analyser for opløst ilt (punkt 33).

32. Membranfiltrer (0,2-0,45 μm) eller centrifuger prøverne i 15 minutter til specifikke analyser (valgfrit). Opbevar i op til 48 timer ved 2-4 °C eller i længere perioder ved – 18 °C, hvis de ikke analyseres straks (hvis det vides, at teststoffet vil forblive upåvirket, foretages forsuring til pH 2 før opbevaring).

Bestemmelse af opløst ilt

33. Bestem koncentrationen af opløst ilt ved hjælp af et kemikalie eller en elektrokemisk metode, der er nationalt eller internationalt anerkendt.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

34. Registrer analyseresultater på de vedføjede resultatskemaer (tillæg 5).

35. Beregn BOD som forskellen i ilttab mellem en ren prøve og en opløsning af teststoffet under testbetingelserne. Divider netto-ilttabet med koncentrationen (vægtprocent) af stoffet for at udtrykke BOD som mg BOD/mg teststof. Nedbrydningen defineres som forholdet mellem det biokemiske iltforbrug og enten, fortrinsvis, det teoretiske iltforbrug (ThOD) eller det kemiske iltforbrug (COD) og udtrykkes i procent (se punkt 36).

36. Beregn bionedbrydningsværdierne for hvert prøvetagningstidspunkt for både test- og referencestoffer under anvendelse af en af følgende to ligninger:

$$\%\ bionedbrydelighed = \frac{mg\ O_2/mg\ testet\ stof}{mg\ ThOD/mg\ testet\ stof} \times 100$$

$$\%\ bionedbrydelighed = \frac{mg\ O_2/mg\ testet\ stof}{mg\ COD/mg\ testet\ stof} \times 100$$

hvor:

ThOD = teoretisk iltforbrug (beregning, tillæg 3)

COD = kemisk iltforbrug, bestemt ved forsøg.

Bemærk: Undertiden giver de to beregningsmåder (procent af ThOD eller procent af COD) ikke de samme resultater, men man skal helst bruge ThOD, da nogle stoffer ikke iltes fuldstændigt i COD-testen.

37. Illustrer forløbet af nedbrydningstesten grafisk i et diagram (se eksempel i afsnittet om »Validitet og fortolkning af resultater«). Hvis der er tilstrækkelige data, beregnes lag-fasen (t_L) og tiden til at nå 50 % fjernelse fra afslutningen af lag-fasen (t_{50}) ud fra bionedbrydningskurven.

38. Såfremt der benyttes specifik analyse (valgfrit), anføres procentdelen af primær nedbrydning som en procentdel specifik stoffjernelse inden for testperioden (korrigeret for resultater af analyse af rene kontroller).

▼M6

Testrapport

39. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata.

Testbetingelser:

— beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet: forurenings- og næringsstatus (kimtal, nitrat, ammonium og eventuelt fosfat)

— prøvens karakteristika (dato for prøvetagning, dybde, udseende, temperatur, saltindhold, DOC (valgfrit), frist mellem opsamling og brug i testen

— (eventuelt) anvendt metode til ældning af havvandet

— anvendt metode til forbehandling (filtrering/sedimentering) af havvandet

— anvendt metode til COD-bestemmelse (hvis den foretages)

— anvendt metode til iltmålinger

— dispersionsprocedure for stoffer, som er tungt opløselige under testbetingelserne

— anvendt metode til bestemmelse af antallet af heterotrofer i havvandet (pladetællingsmetode eller alternativ fremgangsmåde)

— anvendt metode til bestemmelse af DOC i havvand (valgfrit)

— anvendt metode til specifik analyse (valgfrit)

— andre valgfrie metoder anvendt til at karakterisere havvandet (ATP-målinger osv.).

Resultater:

— analysedata registreret på et resultatskema (vedføjede tillæg 5)

— forløbet af nedbrydningstesten grafisk fremstillet i et diagram, som viser lag-fase, (t_L), hældning og tid (med start fra afslutningen af lag-fasen) til at nå 50 % af den endelige iltoptagelse forårsaget af iltning af teststoffet (t_{50}). Lag-fasen kan anslås grafisk som vist i vedføjede figur eller kan med fordel tages som den tid, det kræver at nå 10 % nedbrydning

— procent nedbrydning målt efter 28 dage.

Diskussion af resultaterne

Validitet og fortolkning af resultater

40. Respirationen i en ren kontrol må ikke overstige 30 % af ilten i testkolben. Hvis det ikke er muligt at opfylde dette kriterium med frisk opsamlet havvand, skal havvandet ældes (stabiliseres) før brug.

41. Muligheden for, at kvælstofholdige stoffer kan påvirke resultaterne, bør overvejes.

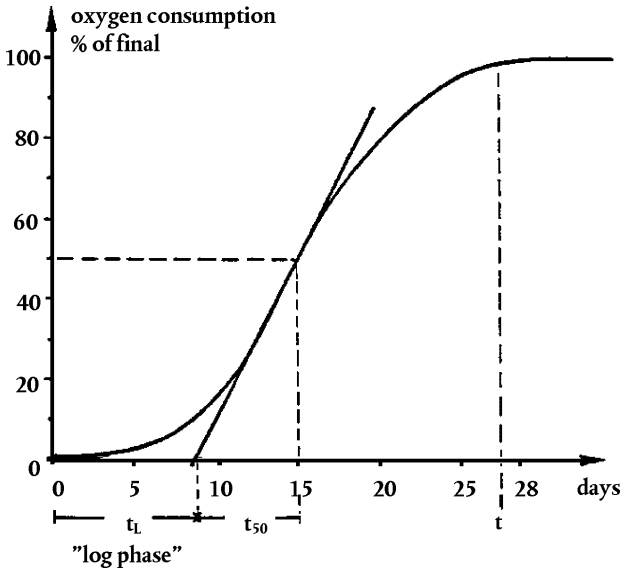
▼M6

42. De resultater, der fås med referencestofferne natriumbenzoat og anilin, bør være sammenlignelige med de resultater, der blev opnået i ringtesten (3) (punkt 9). Hvis de resultater, som opnås med referencestoffer, er atypiske, gentages testen med en anden havvandsprøve.

43. Teststoffet kan betragtes som hæmmende for bakterier (ved den anvendte koncentration), hvis BOD for referenceblandingen og teststofferne ligger under summen af BOD i de separate opløsninger af de to stoffer.

44. På grund af de relativt høje testkoncentrationer sammenlignet med de fleste naturlige systemer og et deraf følgende ugunstigt forhold mellem koncentrationerne af teststof og andre kulstofkilder skal metoden betragtes som en foreløbig test, som kan bruges til at vise, om et stof er let bionedbrydeligt eller ej. I overensstemmelse hermed betyder et lavt resultat derfor ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt i havmiljøer, men viser, at det kræver mere arbejde, hvis det skal fastslås.

Et eksempel på et teoretisk nedbrydningsforsøg, som illustrerer en gennemførlig måde, hvorpå man kan anslå de værdier for t_L (»lag-fasens« længde) og t50 tidsintervallet (der starter ved t_L)), som er nødvendige for at nå 50 % af den endelige iltoptagelse forårsaget af iltning af teststoffet, er anført i nedenstående figur:



LITTERATUR

(1) J.F. de Kreuk og A.O. Hanstveit (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Kapitel C.4-B i dette bilag: Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed, del III, modificeret OECD-screeningtest

(3) N. Nyholm og P. Kristensen (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, marts 1987, Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber.

(4) Kapitel C.11 i dette bilag: Biologisk nedbrydning — Aktiveret slam — respirationshæmningstest.

(5) Kapitel C.4-E i dette bilag: Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed del VI. Closed Bottle Test.

▼**M6**

Tillæg 1

Bestemmelse af organisk kulstof i havvand

RYSTEKOLBEMETODEN

Til bestemmelse af organisk kulstofindhold i en vandprøve iltes de organiske forbindelser i prøven til kuldioxid normalt ved hjælp af en af følgende tre teknikker:

— vådoxidering med persulfat/UV-bestråling

— vådoxidering med persulfat/forhøjet temperatur (116-130 °C);

— forbrænding.

Der foretages en kvantitativ bestemmelse af den udviklede CO_2 under anvendelse af infrarød spektrometri eller titrimetri. Alternativt reduceres CO_2 til methan, som bestemmes kvantitativt på en infrarød flammeiondetektor (FID-analysator).

Persulfat-/UV-metoden benyttes normalt til analyse af »rent« vand med lavt partikelindhold. Sidstnævnte to metoder kan anvendes på de fleste former for vandprøver, idet iltning med persulfat-/forhøjet temperatur er mest egnede til prøver med lavt niveau, og forbrændingsteknikken anvendes til prøver med et ikkeflygtigt organisk kulstofindhold (NVOC) noget over 1 mg C/l.

Indvirkninger

Alle tre metoder afhænger af, at det uorganiske kulstof (IC) i prøven fjernes, eller at der kompenseres for det. Udskilning af CO_2 fra den forsurede prøve er den oftest anvendte metode til at fjerne IC, skønt dette også resulterer i et tab af flygtige organiske forbindelser (1). Den fuldstændige fjernelse af eller kompensation for IC skal sikres for hver enkelt prøvematrix, og flygtigt organisk kulstof (VOC) skal bestemmes ud over NVOC afhængigt af prøvetype.

Høje chloridkoncentrationer resulterer i lavere iltningseffektivitet ved hjælp af persulfat-/UV-metoden (2). Anvendelse af en iltningsreagens modificeret ved tilsætning af kviksølv(II)nitrat kan dog fjerne denne indvirkning. Det anbefales, at det maksimalt tolererede prøvevolumen benyttes til at vurdere hver enkelt type chloridholdige prøve. Høje saltkoncentrationer i prøver, som analyseres ved hjælp af forbrændingsmetoden, kan forårsage saltbelægning af katalysatoren og for stor ætsning af forbrændingsrøret. Der skal tages forholdsregler ifølge producentens manual.

Stærkt uklare prøver samt partikelholdige prøver kan være ufuldstændigt iltede, når persulfat-/UV-metoden anvendes.

Et eksempel på en egnet metode

Ikkeflygtigt organisk kulstof bestemmes ved iltning med persulfat og UV-bestråling og efterfølgende kvantitativ bestemmelse af den udviklede CO_2 under anvendelse af ikkedispersiv infrarød spektrometri.

Iltningsreagensen modificeres i overensstemmelse med forslagene i (2) som beskrevet i producentens manual:

a) 8,2 g $HgCl_2$ og 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ opløses i flere hundrede milliliter reagensvand med lav kulstofkoncentration

b) 20 g $K_2S_2O_8$ opløses i kviksølvsaltopløsningen

▼**M6**

c) 5 ml HNO_3 (konc.) tilsættes blandingen

d) reagensen fortyndes til 1 000 ml.

Indvirkningen fra chlorid fjernes ved hjælp af et 40 µl prøvevolumen til 10 % chlorid og 200 µl prøvemængde til 1,9 % chlorid. Prøver på høje chloridkoncentrationer og/eller større prøvevoluminer kan analyseres ifølge denne metode, forudsat at chloridopbygning i iltningsbeholderen forhindres. Flygtigt organisk kulstof kan efterfølgende bestemmes for den pågældende prøve, hvis det er relevant.

LITTERATUR

(1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16. januar 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Også af interesse (giver en beskrivelse af et automatiseret analysesystem):

(3) W. Schreurs (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼M6

Tillæg 2

Bionedbrydning i havvand

RYSTEKOLBEMETODEN

RESULTATSKEMA

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE:**

3. **TESTSTOF:**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: mg/l som stof

Startkoncentration i mediet, t_o: mg/l som stof

mg DOC/l

4. **HAVVAND:**

Kilde:

Opsamlingsdato:

Prøvetagningsdybde:

Udseende på prøvetagningstidspunktet (f.eks. uklar osv.):

Saltindhold ved prøvetagningen: ‰

Temperatur ved prøvetagningen: °C

DOC »x« timer efter prøvetagningen: mg/l

Forbehandling forud for testning (f.eks. filtrering, sedimentering, ældning osv.):

Kimtal — oprindelig prøve: kolonier/ml

— ved testens begyndelse: kolonier/ml

Andre karakteristika:

5. **KULSTOFBESTEMMELSER:**

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: næringsberiget havvand med teststof	1	a_1					
		a_2					
		middel, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		middel, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Blindprøve: næringsberiget havvand uden teststof	1	c_1					
		c_2					
		middel, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		middel, $C_{d(t)}$					
	middel,$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VURDERING AF RÅDATA:**

Kolbe nr.	Beregning af resultaterne	% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Middel (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Der beregnes ikke gennemsnit af D_1 og D_2, hvis der er en betydelig forskel.

Bemærk: Der kan benyttes lignende opstillinger, når nedbrydning efterfølges af specifik analyse, og til referencestof og toksicitetskontroller.

7. **ABIOTISK NEDBRYDNING (valgfri)**

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Tillæg 3

Beregning af teoretisk biokemisk iltforbrug

CLOSED BOTTLE-METODEN

ThOD for stoffet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvægten MW beregnes ifølge:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Denne beregning indebærer, at C mineraliseres til CO_2, H til H_2O, P til P_2O_5 og Na til Na_2O. Halogen fjernes som hydrogenhalid og kvælstof som ammoniak.

Eksempel:

Glukose $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg glukose$$

Molekylvægt af andre salte end alkalimetallers beregnes ud fra antagelsen om, at saltene er blevet hydroliseret.

Svovl antages at blive iltet til + 6.

Eksempel:

Natrium n-dodecylbenzensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg stof$$

I tilfælde af kvælstofholdige stoffer kan kvælstoffet fjernes som ammoniak, nitrit eller nitrat svarende til forskelligt teoretisk biokemisk iltforbrug.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

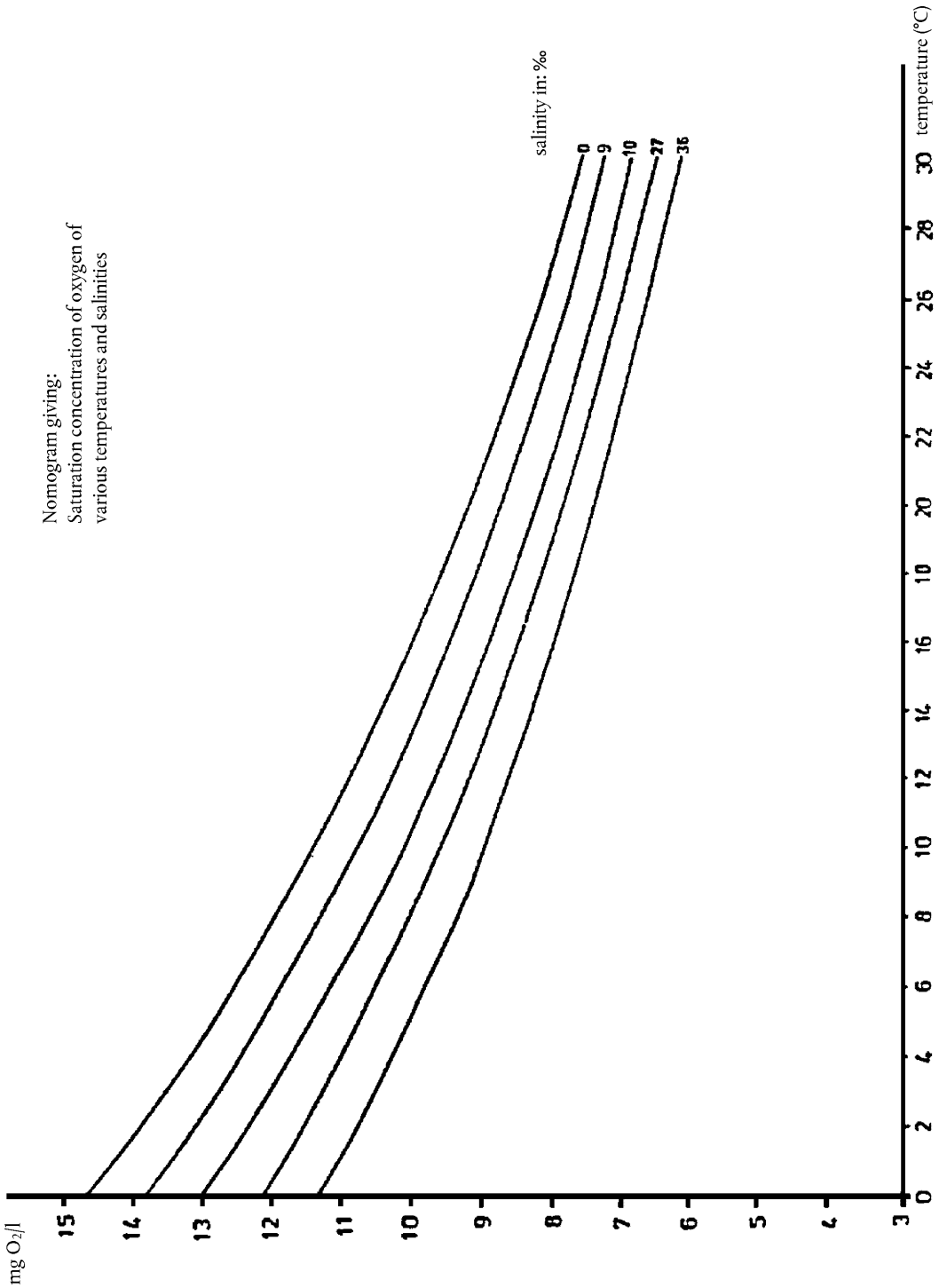
Hvis en fuldstændig nitratdannelse var observeret ved analyse i tilfælde af et sekundært amin:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg stof$$

▼**M6**

Tillæg 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
35
temperature (°C)
mg O2/l

▼M6

Tillæg 5

Bionedbrydning i havvand

CLOSED BOTTLE-METODEN

RESULTATSKEMA

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE:**

3. **TESTSTOF:**

Navn:

Stamopløsningens koncentration:	mg/l
Startkoncentration i havvandsmedium:	mg/l
ThOD eller COD:	mg O_2/mg test-stof

4. **HAVVAND:**

Kilde:

Opsamlingsdato:

Prøvetagningsdybde:

Udseende på prøvetagningstidspunktet (f.eks. uklar osv.):

Saltindhold ved prøvetagningen:	‰
Temperatur ved prøvetagningen:	°C
DOC »x« timer efter prøvetagningen:	mg/l

Forbehandling forud for testning (f.eks. filtrering, sedimentering, ældning osv.):

Kimtal	— oprindelig prøve:	kolonier/ml
	— ved testens begyndelse:	kolonier/ml

Andre karakteristika:

5. **TESTMEDIE:**

Temperatur efter beluftning:	°C
O_2-koncentration efter beluftning og henstand før påbegyndelse af testen:	mg O_2/l

6. **DO-BESTEMMELSE:**

Metode: Winkler/elektrode

	Kolbe nr.		mg O_2/l efter n dage			
			0	5	15	28
Test: næringsberiget havvand med teststof	1	a_1				
	2	a_2				
	Gennemsnit test-værdi	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Kolbe nr.		mg O_2/l efter n dage			
			0	5	15	28
Blindprøve: næringsberiget havvand, men uden teststof	1	c_1				
	2	c_2				
	Gennemsnit blind-værdi	$sm_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Bemærk: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencestoffet og toksicitetskontrollerne.

7. **TAB AF DO: % NEDBRYDNING (% D):**

	Tab af DO efter n dage		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(^{293})}{teststof\ (mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Dette forudsætter, at $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, hvor
$m_{b(o)}$ = blindværdi på dag 0
$m_{t(o)}$ = teststofværdi på dag 0.
Hvis $m_{b(o)}$ ikke er lig med $m_{t(o)}$, benyttes $(m_{t(o)} — m_{t(x)}) — (m_{b(o)} — m_{b(x)})$, hvor
$m_{b(x)}$ = blindværdi på dag x
$m_{t(o)}$ = teststofværdi på dag x.

▼M6

C.43. ORGANISKE STOFFERS ANAEROBE BIONEDBRYDELIGHED I UDRÅDNET SLAM: VED MÅLING AF GASPRODUKTION

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 311 (2006). Der findes en række screeningtest til vurdering af organiske stoffers aerobe bionedbrydelighed (testmetode C.4, C.9, C.10 og C.11 (1) og OECD TG 302C (2)), og resultaterne af at anvende disse er blevet brugt med succes til at forudsige stoffers skæbne i aerobt miljø, især i de aerobe stadier af spildevandsrensningen. Forskellige mængder af vanduopløselige stoffer samt stoffer, der adsorberer til fast affald, behandles også aerobt, eftersom de er til stede i bundfældet spildevand. De større fraktioner af disse stoffer bindes dog til primært bundfældet slam, der skilles fra ubearbejdet spildevand i bundfældningstanke, før det bundfældede spildevand, eller supernatanten, behandles aerobt. Slammet, som indeholder nogle af de opløselige stoffer i den interstitielle væske, føres herefter til opvarmede rådnetanke med henblik på anaerob behandling. Indtil nu findes der ingen test i denne række til vurdering af anaerob bionedbrydelighed i anaerobe rådnetanke, og denne test har til formål at fylde dette tomrum. Den kan ikke nødvendigvis anvendes på andre anoxiske delmiljøer.

2. Respirometriske metoder til at måle mængderne af produceret gas, især (CH_4) og kuldioxid (CO_2), under anaerobe betingelser er blevet brugt med succes til at vurdere anaerob bionedbrydelighed. Birch et al. (3) gennemgik disse fremgangsmåder og konkluderede, at Shelton og Tiedjes (4) arbejde baseret på tidligere undersøgelser (5)(6)(7) var det mest omfattende. Metoden (4), som blev videreudviklet af andre (8) og er blevet amerikanske standarder (9)(10), løste ikke problemerne med CO_2's og CH_4's forskellige opløselighed i testmediet og beregningen af et teststofs teoretiske gasproduktion. I ECETOC-rapporten (3) anbefaledes den supplerende måling af opløst uorganisk kulstofindhold (DIC) i den ovenstående væske, hvilket gjorde teknikken mere bredt anvendelig. ECETOC-metoden blev underkastet en international kalibrering (eller ringtest) og blev ISO-standard, ISO 11734 (11).

3. Denne testmetode, som er baseret på ISO 11734 (11), beskriver en screeningsmetode til vurdering af organiske stoffers potentielle anaerobe bionedbrydelighed under en bestemt betingelse (dvs. i en anaerob rådnetank på et givet tidspunkt og ved en given koncentration af mikroorganismer). Fordi der anvendes fortyndet slam med en relativt høj teststofkoncentration, og testen typisk varer længere end retentionstiden i anaerobe rådnetanke, svarer testbetingelserne ikke nødvendigvis til betingelserne i anaerobe rådnetanke, og testen kan heller ikke anvendes til vurdering af organiske stoffers anaerobe bionedbrydelighed under forskellige miljøbetingelser. Slam eksponeres for teststoffet i op til 60 dage, hvilket er længere end den normale slamretentionstid (25-30 dage) i anaerobe rådnetanke, selv om retentionstiderne kan være meget længere på industriområder. Der kan ikke forudsiges noget på grundlag af resultaterne af denne test med samme vægt, som det er tilfældet med aerob bionedbrydning, eftersom den eksisterende dokumentation om teststoffernes egenskaber i »let« aerobe test og i simulationstest og det aerobe miljø er tilstrækkelig til at have tiltro til, at der er en forbindelse. Der findes kun lidt tilsvarende dokumentation for det anaerobe miljø. En fuldstændig anaerob bionedbrydelighed kan antages at forekomme, hvis der opnås 75-80 % teoretisk gasproduktion. De høje forhold mellem stof og biomasse, der er brugt i disse test, betyder, at et stof, der går igennem, har højere sandsynlighed for at blive nedbrudt i en anaerob rådnetank. Endvidere forefindes de stoffer, som ikke omdannes til gas i testen, måske

▼M6

ikke nødvendigvis ved mere miljømæssigt realistiske forhold mellem stof og biomasse. Andre anaerobe reaktioner forekommer også, hvorved stoffer kan blive i hvert fald delvist nedbrudt, f.eks. ved afchlorering, men denne test påviser ikke sådanne reaktioner. Ved at anvende specifikke analysemetoder til at bestemme teststoffet kan dets forsvinden dog overvåges (se punkt 6, 30, 44 og 53).

PRINCIP FOR TESTEN

4. Vasket udrådnet slam ([1]), som indeholder lave (< 10 mg/l) koncentrationer af uorganisk kulstof (IC), fortyndes omkring ti gange til en samlet koncentration af faste stoffer på 1 g/l til 3 g/l og inkuberes ved 35 °C ± 2 °C i lukkede beholdere med teststoffet ved 20-100 mg C/l i op til 60 dage. Der er mulighed for at måle slamaktiviteten ved at foretage parallelle blindkontroller med inokulum af slam i mediet, men uden teststof.

5. Stigningen i headspacetrykket i beholderne som følge af produktionen af kuldioxid og methan måles. Meget af den producerede CO_2 vil blive opløst i væskefasen eller omdannet til carbonat eller hydrogencarbonat under testbetingelserne. Dette uorganiske kulstof måles ved afslutningen af testen.

6. Mængden af kulstof (uorganisk plus methan) fra bionedbrydningen af teststoffet beregnes ud fra nettogasproduktionen og nettodannelsen af IC i væskefasen ud over blindkontrolværdierne. Bionedbrydningens omfang beregnes ud fra den samlede mængde IC og methan-C, som produceres, i procent af den målte eller beregnede mængde kulstof, der tilsættes som teststof. Forløbet af bionedbrydningen kan følges ved kun at foretage mellemliggende målinger af gasproduktionen. Yderligere kan den primære bionedbrydning bestemmes ved specifikke analyser ved testens begyndelse og afslutning.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

7. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Teststoffets organiske kulstofindhold (vægtprocent) skal være kendt enten fra sin kemiske struktur eller ved måling. For flygtige teststoffer kan en målt eller beregnet Henrys lovkonstant bruges til at afgøre, om testen kan anvendes. Information om teststoffets toksicitet over for anaerobe bakterier kan bruges til at vælge en passende testkoncentration og fortolke resultater, der påviser lav bionedbrydelighed. Kontrol for hæmning bør medtages, medmindre det er påvist, at teststoffet ikke hæmmer anaerobe mikrobielle aktiviteter (se punkt 21 og ISO 13641-1 (12)).

([1]) Udrådnet slam er en blanding af de bundfældede faser af spildevandsslam og aktiveret slam, der er blevet inkuberet i en anaerob rådnetank ved omkring 35 °C for at reducere biomasse- og lugtproblemer og forbedre slammets afvandingsevne. Det består af en sammensætning af anaerobe fermentative og methandannende bakterier, som producerer kuldioxid og methan (11).

▼M6

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

8. Testmetoden kan anvendes på vandopløselige stoffer og kan også anvendes på tungtopløselige og uopløselige stoffer, forudsat at der benyttes en metode med nøjagtig dosering, se f.eks. ISO 10634 (13). Generelt skal der for flygtige stoffer træffes en beslutning for hvert enkelt stof. Der skal måske træffes særlige foranstaltninger for f.eks. ikke at frigive gas under testen.

REFERENCESTOFFER

9. For at kontrollere fremgangsmåden testes et referencestof ved at opstille egnede beholdere parallelt som led i de almindelige testforløb. Phenol, natriumbenzoat og polyethylenglycol 400 er eksempler og forventes at nedbrydes med over 60 % teoretisk gasproduktion (dvs. methan og uorganisk kulstof) inden for 60 dage (3)(14).

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. I en international ringtest (14) var der god reproducerbarhed i gastrykmålinger mellem tre beholdere. Den relative standardafvigelse (variationskoefficient, CV) var hovedsagelig under 20 %, skønt denne værdi ofte steg til > 20 % i nærværelse af toksiske stoffer eller hen imod slutningen af den 60 dages inkubationsperiode. Højere afvigelser blev også påvist i beholdere med et volumen på < 150 ml. Endelige pH-værdier for testmediet lå i området 6,5-7,0.

11. Følgende resultater blev opnået i ringtesten:

Teststof	Samlede data n_1	Gennemsnitlig nedbrydning (af samlede data) (%)	Relativ standard-afvigelse (af samlede data) (%)	Valide data n2	Gennem-snitlig nedbrydning (af valide data) (%)	Relativ stan-dard-afvigelse (af valide data) (%)	Data > 60 % Nedbryd-ning i valide test n_3
Palmitin-syre	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyethylen Glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Andel af n_2

12. Variationskoefficienterne af gennemsnittet for alle værdier opnået med palmitinsyre og polyethylenglycol 400 var helt oppe på henholdsvis 45 % (n = 36) og 35 % (n = 38). Når værdier på < 40 % og > 100 % blev udeladt (den førstnævnte antages at skyldes suboptimale betingelser, sidstnævnte har ukendte årsager), blev CV'erne reduceret til henholdsvis 26 % og 23 %. Andelen af »valide« værdier, der nåede mindst 60 % nedbrydning, var 70 % for palmitinsyre og 83 % for polyethylenglycol 400. Andelene af den procentvise bionedbrydning, der stammer fra DIC-målinger, var relativt lave, men variable. For palmitinsyre var området 0-35 %, gennemsnittet 12 %, med CV på 92 % og for polyethylenglycol 400 0-40 %, gennemsnit 24 %, med CV på 54 %.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparater

13. Der skal anvendes sædvanligt laboratorieudstyr og følgende udstyr:

a. inkubator — gnistsikker og styret til 35 °C ± 2 °C

▼M6

b. trykmodstandsdygtige testbeholdere af glas med en passende nominel størrelse ([1]), hver udstyret med et gastæt låg, som kan modstå ca. 2 bar. Headspacevolumen bør være omkring 10-30 % af det samlede volumen. Hvis der jævnligt udledes biogas, er omkring 10 % headspacevolumen passende, men hvis der kun udledes gas ved afslutningen af testen, er 30 % passende. Serumflasker af glas med et nominelt volumen på 125 ml, og et samlet volumen på ca. 160 ml, forseglet med serumflaskesepta ([2]) og crimplåg (aluminiumsringe) anbefales, når trykket udløses på hvert prøvetagningstidspunkt

c. trykmåler ([3]), der er tilpasset til at kunne måle og udlufte den producerede gas, f.eks. en håndholdt præcisionstrykmåler, som er forbundet med en passende kanyle; en gastæt trevejsventil letter frigivelsen af overtryk (tillæg 1). Det er nødvendigt at holde det indre volumen i tryktransducerrør og -ventil så lavt som muligt, således at fejl, der opstår, hvis der ikke tages hensyn til udstyrets volumen, bliver ubetydelige

Bemærk — Trykaflæsningerne bruges direkte til at beregne mængden af kulstof produceret i headspacet (punkt 42-44). Alternativt kan trykaflæsningerne omregnes til volumener (ved 35 °C atmosfærisk tryk) produceret gas ved hjælp af en omregningskurve. Denne kurve konstrueres på grundlag af data, som fremkommer ved at indsprøjte et kendt volumen kvælstofgas ind i en række testbeholdere (f.eks. serumflasker) med en temperatur på 35 ° +/– 2 °C, og registrere de deraf følgende stabiliserede trykaflæsninger (se tillæg 2). Beregningen vises i bemærkningen i punkt 44.

Advarsel — Pas på nålestikskader ved brug af mikrosprøjter.

d. kulstofanalysator egnet til direkte bestemmelse af uorganisk kulstof i området 1 mg/l til 200 mg/l

e. sprøjter med høj præcision til gasformige og flydende prøver

f. magnetomrørere og stangmagneter (valgfrit)

g. handskekasse (anbefales).

Reagenser

14. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen.

([1]) Den anbefalede størrelse er 0,1-1,0 liter.

([2]) Det anbefales at bruge gastætte silikonesepta. Det anbefales desuden, at lågenes gastæthed, navnlig septa af butylgummi, testes, da flere kommercielt tilgængelige septa ikke er tilstrækkeligt gastætte mod methan, og visse septa ikke forbliver tætte, når de gennembores med en nål under testbetingelserne.

([3]) Måleren bør bruges og kalibreres med regelmæssige mellemrum i henhold til producentens anvisninger. Hvis der bruges en trykmåler af den foreskrevne kvalitet, f.eks. indkapslet med en stålmembran, er det ikke nødvendigt med kalibrering i laboratoriet. Kalibreringens nøjagtighed kan kontrolleres i laboratoriet med en etpunktsmåling ved 1×10^5 Pa i forhold til en trykmåler med mekanisk display. Når dette punkt måles korrekt, vil lineariteten også være uændret. Hvis der bruges andet måleudstyr (uden certificeret kalibrering hos producenten), anbefales kalibrering i hele området med regelmæssige mellemrum.

▼M6

Vand

15. Brug destilleret eller deioniseret vand (afiltet ved at gennemboble med kvælstofgas indeholdende under 5 µl/l ilt), som indeholder under 2 mg/l opløst organisk kulstof (DOC).

Testmedium

16. Fortyndingsmediet fremstilles således, at det indeholder følgende bestanddele i de angivne mængder:

Vandfrit kaliumdihydrogenfosfat, (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatriumhydrogenfosfatdodecahydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	0,53 g
Calciumchloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Magnesiumchloridhexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Jern(II)chloridtetrahydrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (iltindikator)	0,001 g
Natriumsulfidnonahydrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Stamopløsning af sporstoffer (valgfrit, punkt 18)	10 ml
Tilsæt afiltet vand (punkt 15)	til 1 liter

Bemærk: Brug frisk natriumsulfid, eller vask og tør det før brug for at sikre, at det har tilstrækkelig reducerende kapacitet. Testen kan udføres uden brug af handskekasse (se punkt 26). I så fald øges slutkoncentrationen af natriumsulfid i mediet til 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ pr. liter. Natriumsulfid kan også tilsættes fra en passende anaerob stamopløsning gennem septum på de lukkede testbeholdere, eftersom denne fremgangsmåde vil mindske risikoen for iltning. Natriumsulfid kan erstattes af titanium(III)citrat, som tilsættes gennem septum af de lukkede testbeholdere ved en slutkoncentration på 0,8-1,0 mmol/l. Titanium(III)citrat er et meget effektivt reduktionsmiddel med lav toksicitet, der fremstilles som følger: Opløs 2,94 g trinatriumcitrat-dihydrat i 50 ml afiltet vand (hvilket giver en opløsning på 200 mmol/l), og tilsæt 5 ml 15 % (vægtprocent) titanium(III)chloridopløsning. Neutraliser til pH 7 ± 0,2 med mineralsk alkali, og hæld i en passende beholder med en strøm af kvælstof. Koncentrationen af titanium(III)citrat i denne stamopløsning er på 164 mmol/l.

17. Bland bestanddelene i testmediet undtagen reduktionsmidlet (natriumsulfid titaniumcitrat) og sprøjt opløsningen med kvælstofgas i ca. 20 min. umiddelbart før brug for at fjerne ilten. Tilsæt herefter en passende mængde frisk fremstillet opløsning af reduktionsmidlet (fremstillet af afiltet vand), lige før mediet skal bruges. Tilpas eventuelt mediets pH med fortyndet uorganisk syre eller alkali til 7 ± 0,2.

▼M6

Stamopløsning af sporstoffer (valgfrit)

18. Testmediet bør indeholde følgende sporstoffer for at øge anaerobe nedbrydningsprocesser, især hvis der benyttes lave koncentrationer (f.eks. 1 g/l) af inokulum (11).

Manganchloridtetrahydrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borsyre (H_3BO_3)	5 mg
Zinkchlorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Kobber(II)chlorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatriummolybdatdihydrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Cobaltchloridhexahydrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikkelchloridhexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Tilsæt afiltet vand (punkt 15)	til 1 liter

Teststof

19. Tilsæt teststoffet som en stamopløsning, suspension, emulsion eller direkte som fast eller flydende stof eller absorberet på et glasfiberfilter for at få en koncentration på højst 100 mg/l organisk kulstof. Hvis der anvendes stamopløsninger, fremstilles en egnet opløsning med vand (punkt 15) (tidligere afiltet ved at besprøjtning med kvælstofgas) af en sådan styrke, at det tilsatte volumen er mindre end 5 % af den samlede mængde reaktionsblanding. Tilpas eventuelt stamopløsningens pH til pH 7 ± 0,2. Er der tale om teststoffer, som ikke er tilstrækkeligt opløselige i vand, henvises til ISO 10634 (13). Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, klargøres en supplerende kontrol, hvor der kun tilsættes opløsningsmiddel til det inokulerede medium. Organiske opløsningsmidler, som er kendt for at hæmme methanproduktionen, såsom chloroform og carbontetrachlorid, bør undgås.

Advarsel — Toksiske teststoffer og stoffer, hvis egenskaber er ukendte, skal håndteres forsigtigt.

Referencestoffer

20. Referencestoffer, såsom natriumbenzoat, phenol og polyethylenglycol 400 er blevet brugt med held til at kontrollere fremgangsmåden, idet de nedbrydes over 60 % inden for 60 dage. Fremstil en stamopløsning (i afiltet vand) af det valgte referencestof på samme måde som for teststoffet og tilpas eventuelt til pH 7 ± 0,2.

Kontrol for hæmning (betinget)

21. For at få information om teststoffets toksicitet over for anaerobe mikroorganismer for at finde den mest egnede testkoncentration tilsættes teststof og referencestof til en beholder, der indeholder testmediet (se punkt 16), hver især med de samme koncentrationer, som blev tilsat (se punkt 19-20 og se endvidere ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Udrådnet slam

22. Udtag udrådnet slam fra en rådnetank på et rensningsanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Slammet skal være fuldstændig karakteriseret, og baggrundsoplysningerne om det registreres (se punkt 54). Hvis det er meningen, at der skal bruges et tilpasset inokulum, kan det overvejes at bruge udrådnet slam fra et industrielt rensningsanlæg. Brug kolber med bred hals fremstillet af polyethylen med høj densitet eller et tilsvarende materiale, som kan udvides, til opsamling af udrådnet slam. Tilsæt slam til omkring 1 cm fra toppen af kolberne og luk dem tæt, helst med en sikkerhedsventil. Efter transport til laboratoriet kan den opsamlede slam bruges direkte eller anbringes i en rådnetank i laboratoriestørrelse. Frigiv overskydende biogas ved forsigtigt at åbne kolberne med slam. Alternativt kan laboratoriedyrket anaerobt slam bruges som kilde til inokulum, men dets aktivitetsspektrum kan være blevet hæmmet.

Advarsel — Udrådnet slam producerer brandfarlige gasser, som indebærer brand- og eksplosionsrisici: Det indeholder også potentielt patogene organismer, og der skal derfor træffes passende forholdsregler i forbindelse med håndtering af slam. Af sikkerhedsmæssige årsager må der ikke bruges glasbeholdere til opsamling af slam.

23. For at reducere produktionen af baggrundsgas og mindske indflydelsen fra blindkontrollerne, kan det overvejes at udrådne slammet på forhånd. Er der brug for udrådning på forhånd, bør slammet rådne uden tilsætning af næringsstoffer eller substrater ved 35 °C ± 2 °C i op til 7 dage. Det er påvist, at udrådning på forhånd i omkring fem dage normalt giver et optimalt fald i blindprøvens gasproduktion uden uacceptable stigninger i hverken lag- eller inkubationsperioder i testfasen eller tab af aktivitet hen imod et lille antal testede stoffer.

24. For teststoffer, som er eller forventes at være svært bionedbrydelige, overvejes præeksponering af slammet for teststoffet for at få et bedre tilpasset inokulum. I så fald tilsættes teststoffet med en organisk kulstofkoncentration på 5 mg/l til 20 mg/l til den udrådede slam og inkuberes i op til to uger. Vask den præeksponerede slam grundigt før brug (se punkt 25) og anfør præeksponeringsbetingelserne i testrapporten.

Inokulum

25. Vask slammet (se punkt 22-24) lige før brug for at reducere IC-koncentrationen til under 10 mg/l i den endelige testsuspension. Centrifuger slammet i lukkede rør (f.eks. 3 000 g i 5 minutter), og udled supernatanten. Suspender den resulterende pellet i afiltet medium (punkt 16-17), centrifuger suspensionen igen og udled supernatantvæsken. Hvis IC ikke er blevet sænket tilstrækkeligt, kan vaskningen af slammet gentages højst to gange. Dette ser ikke ud til at påvirke mikroorganismerne negativt. Suspender endelig pelleten i den nødvendige mængde testmedium og bestem koncentrationen af den samlede mængde tørstof [e.g. ISO 11923 (15)]. Slutkoncentration af den samlede mængde tørstof i testbeholderne bør ligge mellem 1 g/l og 3 g/l (eller omkring 10 % af mængden i ufortyndet udrådnet slam). Udfør ovennævnte operationer på en sådan måde, at slammet har minimal kontakt med ilt (brug f.eks. en nitrogenatmosfære).

▼M6

TESTPROCEDURE

26. Udfør følgende indledende procedurer under anvendelse af teknikker, der holder kontakten mellem udrådnet slam og ilt så lav som praktisk muligt, f.eks. kan det være nødvendigt at arbejde i en handskekasse i en nitrogenatmosfære og/eller rense kolberne med kvælstof (4).

Forberedelse af test og kontrolassays

27. Klargør mindst tre testbeholdere (se punkt 13 b)) til teststoffet, blindkontroller, referencestof, kontroller for hæmning (betinget) og trykkontrolkamre (valgfri fremgangsmåde) (se punkt 7 og 19-21). Der kan også klargøres supplerende beholdere med det formål at vurdere primær bionedbrydning ved hjælp af teststofspecifikke analyser. Den samme række blindkontroller kan bruges til flere teststoffer i den samme test, så længe headspacevolumen er konsistent.

28. Fremstil det fortyndede inokulum, før det tilsættes til beholderne, f.eks. ved hjælp af en pipette med stor åbning. Tilsæt aliquoter af velblandet inokulum (punkt 25), således at koncentrationen af samlet tørstof er den samme i alle beholdere (mellem 1 g/l og 3 g/l). Tilsæt eventuelt stamopløsninger af test- og referencestof efter eventuel tilpasning til pH 7 ± 0,2. Teststoffet og referencestoffet tilsættes under anvendelse af den mest hensigtsmæssige administrationsvej (punkt 19).

29. Testkoncentrationen af organisk kulstof bør normalt ligge på 20-100 mg/l (punkt 4). Hvis teststoffet er toksisk, reduceres testkoncentrationen til 20 mg C/l eller endnu mindre, hvis blot den primære bionedbrydning skal måles med specifikke analyser. Det skal bemærkes, at variabiliteten af testresultaterne stiger ved lavere testkoncentrationer.

30. For blindprøver tilsættes en tilsvarende mængde af det bærestof, der anvendes til at dosere teststoffet, i stedet for en stamopløsning, suspension eller emulsion. Hvis teststoffet blev administreret ved hjælp af glasfiberfiltre eller organiske opløsningsmidler, tilsættes blindprøverne et filter eller en tilsvarende mængde opløsningsmiddel, som er fordampet. Fremstil et ekstra replikat med teststof til måling af pH-værdi. Tilpas eventuelt pH til 7 ± 0,2 med små mængder fortyndet uorganisk syre eller alkali. De samme mængder neutraliseringsmidler tilsættes til alle testbeholdere. Disse tilsætninger bør ikke være nødvendige, eftersom pH-værdien af stamopløsningerne af teststof og referencestof allerede er blevet tilpasset (se punkt 19-20). Hvis der skal måles primær bionedbrydning, udtages en passende prøve fra pH-kontrolbeholderen eller fra en supplerende testbeholder, og teststofkoncentrationen måles ved hjælp af særlige analyser. Overtrukne magneter kan tilsættes til alle beholdere, hvis reaktionsblandingerne skal omrøres (valgfrit).

31. Sørg for, at det samlede volumen af væske V_l og headspacevolumen V_h er det samme i alle beholdere, og noter og registrer værdierne af V_l og V_h. Hver beholder forsegles med et gastæt septum og overføres fra handskekassen (se punkt 26) til inkubatoren (se punkt 13 a)).

▼M6

Uopløselige teststoffer

32. Tilsæt afvejede mængder af stoffer, som er tungt opløselige i vand, direkte i de klargjorte beholdere. Når det er nødvendigt at bruge et opløsningsmiddel (se punkt 19), overføres teststofopløsningen eller -suspensionen til de tomme beholdere. Fordamp opløsningsmidlet, hvor det er muligt, ved at lede kvælstofgas gennem beholderne og derefter tilsætte de øvrige ingredienser, dvs. fortyndet slam (punkt 25) og afiltet vand efter behov. Der klargøres også en supplerende opløsningsmiddelkontrol (se punkt 19). Med hensyn til andre metoder til tilsætning af uopløselige stoffer henvises til ISO 10634 (13). Flydende teststoffer kan doseres med en sprøjte ind i de fuldstændigt klargjorte forseglede beholdere, hvis det forventes, at den initiale pH ikke vil blive overskredet 7 ± 1, ellers doser som beskrevet ovenfor (se punkt 19).

Inkubation og gastrykmålinger

33. Inkuber de klargjorte beholdere ved 35 °C ± 2 °C i omkring 1 time for at give mulighed for ækvilibrering og frigivelse af overskydende gas til atmosfæren, f.eks. ved successivt at ryste hver beholder, føre trykmålerens nål (punkt 13 c)) gennem låget og åbne ventilen, indtil trykmåleren viser nul. Hvis headspacetrykket på dette tidspunkt, eller når der foretages mellemmålinger, ligger under det atmosfæriske tryk, føres kvælstofgas ind for at genoprette atmosfærisk tryk. Luk ventilen (se punkt 13 c)), og fortsæt inkubationen i mørke, idet det sikres, at alle dele af beholderne holdes på udrådningstemperaturen. Observer beholderne efter inkubation i 24-48 timer. Kasser beholdere, hvis indholdet af beholderne viser en tydelig lyserødfarvning i supernatantvæsken, dvs. hvis Resazurin (se punkt 16) har ændret farve, hvilket viser tilstedeværelsen af ilt (se punkt 50). Mens systemet måske kan tåle små mængder ilt, kan højere koncentrationer i alvorlig grad hæmme det anaerobe bionedbrydningsforløb. Det kan accepteres, at en enkelt beholder i et sæt på tre af og til kasseres, men forekomsten af flere fejl end det skal give anledning til en undersøgelse af forsøgsprocedurerne samt en gentagelse af testen.

34. Bland indholdet i hver beholder grundigt ved at røre eller ryste den et par minutter mindst 2-3 gange om ugen og kort tid før hver trykmåling. Rystning resuspenderer inokulummet og sikrer gasbalance. Alle trykmålinger foretages hurtigt, eftersom temperaturen i testbeholderne kan falde, hvilket fører til falske aflæsninger. Under trykmåling bevares hele testbeholderen, inklusive headspace, på udrådningstemperaturen. Mål gastrykket ved f.eks. at indføre kanylen (punkt 13 c)), der er forbundet til trykmåleren, gennem septummet. Der må ikke komme vand ind i kanylen, hvis det sker, skal de våde dele tørres, og en ny nål påsættes. Trykket måles i millibar (se punkt 42). Gastrykket i beholderne kan måles jævnligt, f.eks. ugentligt, og overskydende gas kan eventuelt frigives til atmosfæren. Alternativt måles trykket kun ved testens afslutning for at bestemme, hvor meget biogas der er produceret.

35. Det anbefales at foretage mellemliggende aflæsninger af gastrykket, da trykstigning giver et fingerpeg om, hvornår testen kan afsluttes, og giver mulighed for at følge kinetikken (se punkt 6).

▼M6

36. Testen afsluttes normalt efter en inkubationsperiode på 60 dage, medmindre den bionedbrydningskurve, trykmålingerne har givet, forinden er nået plateaufasen, dvs. den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig. Hvis plateauværdien er under 60 %, bliver fortolkningen problematisk, fordi det betyder, at kun en del af molekylet er blevet mineraliseret, eller at der er begået en fejl. Hvis der produceres gas i slutningen af den normale inkubationsperiode, men plateaufasen tydeligvis ikke er nået, bør det overvejes at forlænge testen for at kontrollere, om plateauet (> 60 %) vil blive nået.

Måling af uorganisk kulstof

37. Ved afslutningen af testen efter den sidste gastrykmåling lader man slammet bundfælde sig. Åbn successivt hver beholder, og udtag straks en prøve til bestemmelse af koncentrationen (mg/l) af uorganisk kulstof (IC) i supernatantvæsken. Supernatantvæsken må hverken centrifugeres eller filtreres, da dette medfører et uacceptabelt tab af opløst kuldioxid. Hvis væsken ikke kan analyseres ved at udtage prøver, opbevares den i et forseglet glas uden headspace og nedkølet til omkring 4 °C i op til 2 dage. After IC-målingen måles og registreres pH-værdien.

38. Alternativt kan IC i supernatanten bestemmes indirekte ved at frigive den opløste IC som kuldioxid, der kan måles i headspacet. Efter den sidste måling af gastryk, justeres trykket i hver af testbeholderne til atmosfærisk tryk. Forsur indholdet af hver beholder til omtrent pH 1 ved at tilsætte koncentreret uorganisk syre (f.eks. H_2SO_4) gennem de forseglede beholderes septum. Inkuber de rystede beholdere ved 35 °C ± 2 °C i ca. 24 timer, og mål det gastryk, der skabes af den udviklede kuldioxid, ved hjælp af en trykmåler.

39. Foretag lignende aflæsninger for den tilsvarende blindprøve, referencestof og eventuelle beholdere til hæmningskontrol (se punkt 21).

40. I nogle tilfælde, især hvis de samme kontrolbeholdere bruges til flere teststoffer, bør det overvejes at foretage målinger af IC-middelkoncentrationer i test- og kontrolbeholdere. I så fald klargøres et tilstrækkeligt antal beholdere til alle de mellemliggende målinger. Denne fremgangsmåde foretrækkes frem for at udtage alle prøver fra en beholder. Det sidste kan kun gøres, hvis det nødvendige volumen til DIC-analyse ikke anses for at være for høj. DIC-målingen foretages efter måling af gastrykket uden frigivelse af overskydende gas som beskrevet i det følgende:

— udtag et så lille volumen af supernatantprøver som muligt med en kanyle gennem septum uden at åbne beholderne, og bestem IC i prøven

— når prøven er udtaget, udledes den overskydende gas eventuelt

— det tages i betragtning, at selv et lille fald i supernatantvolumen (f.eks. omkring 1 %) kan give en betydelig stigning i gasvolumen i headspace (V_h)

— ligningerne (se punkt 44) korrigeres ved om nødvendigt at øge V_h i ligning 3.

▼M6

Specifikke analyser

41. Hvis der skal bestemmes primær anaerob nedbrydning (se punkt 30), udtages et passende prøvevolumen til specifikke analyser fra beholdere, som indeholder teststoffet, ved testens begyndelse og afslutning. Bemærk, hvis dette gøres, at volumener af headspace (V_h) og væske (V_l) ændres, og tag højde for det ved beregning af resultaterne af gasproduktion. Alternativt kan der udtages prøver til specifikke analyser fra supplerende blandinger, som tidligere er fremstillet til det formål (punkt 30).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Af praktiske grunde måles gastrykket i millibar (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa, 1 Pa = 1 N/m^2), volumen i liter og temperatur i grader Celsius.

Kulstof i headspace

43. Da 1 mol methan og 1 mol kuldioxid hver indeholder 12 g kulstof, kan kulstofmassen i en given mængde udviklet gas udtrykkes som:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ligning [1]}$$

hvor:

m = kulstofmasse (mg) i en given mængde udviklet gas

12 = relativ atommasse af kulstof

n = antal mol gas i et givet volumen.

Hvis der genereres andre gasser i betydelige mængder end methan eller kuldioxid (f.eks. N_2O), ændres formlen [1] med henblik på at beskrive muligheden for effekter af de genererede gasser.

44. Fra gaslovene kan n udtrykkes som:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ligning [2]}$$

hvor:

p = gastryk (pascal)

V = gasvolumen (m^3)

R = gaskonstant [8.314J/(mol K)]

T = inkubationstemperatur (kelvin)

Ved kombination af ligning [1] og [2] og rationalisering for at give mulighed for produktion af gas i en blindkontrol:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ligning [3]}$$

hvor:

m_h = masse af nettokulstof produceret som gas i headspace (mg)

Δp = middelværdien af forskellen mellem start- og sluttryk i testbeholderne og den tilsvarende middelværdi i blindbeholderne (millibar)

▼**M6**

V_h = headspacevolumen i beholderen (l)

0,1 = omregning af både newton/m^2 til millibar og m^3 til liter.

Ligning [4] bruges til den normale inkubationstemperatur på 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Ligning [4]}$$

Bemærk: Alternativ volumenberegning. Trykmåleraflæsninger omregnes til ml produceret gas ved hjælp af standardkurven, som genereres ved at optegne indsprøjtet volumen (ml) i forhold til måleraflæsning (tillæg 2). Antallet af mol (n) gas i hver beholders headspace beregnes ved at dividere den akkumulerede gasproduktion (ml) med 25 286 ml/mol, som er det volumen, en mol gas optager ved 35 °C og atmosfærisk standardtryk. Da 1 mol CH_4 og 1 mol CO_2 hver indeholder 12 g kulstof, fremkommer mængden af kulstof (mg) i headspace (m_h) ved ligning [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ligning [5]}$$

Rationalisering for at give mulighed for produktion af gas i en blindkontrol:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \quad \text{Ligning [6]}$$

hvor:

m_h = masse af nettokulstof produceret som gas i headspace (mg)

ΔV = gennemsnit af forskellen mellem volumen gas produceret i headspace i testbeholderne og blindkontrolbeholderne

25286 = volumen optaget af 1 mol gas ved 35 °C, 1 atmosfære.

45. Bionedbrydningsforløbet kan følges ved at optegne den akkumulerede trykstigning Δp (millibar) i forhold til tid, hvis det er relevant. Identificer og registrer lag-fasen (dage) fra denne kurve. Lag-fasen er tiden fra testens start, til der indtræffer signifikant nedbrydning (se et eksempel i tillæg 3). Hvis der blev taget og analyseret mellemliggende supernatantprøver (se punkt 40, 46 og 47), kan det samlede producerede C (i gas plus i væsken) optegnes i stedet for kun det akkumulerede tryk.

Kulstof i væsken

46. Der ses bort fra mængden af methan i væsken, eftersom dens vandopløselighed er kendt for at være meget lav. Beregn massen af uorganisk kulstof i væsken i testbeholderne ved hjælp af ligning [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Ligning [7]}$$

hvor:

m_l = massen af uorganisk kulstof i væsken (mg)

C_{net} = middelværdien af forskellen mellem koncentrationen af uorganisk kulstof i testbeholderne og den i kontrolbeholderne ved testens afslutning (mg/l)

V_l = væskevolumen i beholderen (l)

▼M6

Samlet forgasset kulstof

47. Beregn den samlede masse af forgasset kulstof i beholderen ved hjælp af ligning [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Ligning [8]}$$

hvor:

m_t = samlet masse af forgasset kulstof (mg)

m_h og m_l er som defineret ovenfor.

Teststoffets kulstofindhold

48. Beregn massen af kulstof i testbeholderne udledt af det tilsatte teststof ved hjælp af ligning [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Ligning [9]}$$

hvor:

m_v = teststoffets kulstofmasse (mg)

C_c = teststoffets kulstofkoncentration i testbeholderen (mg/l)

V_l = væskevolumen i testbeholderen (l).

Bionedbrydningens omfang

49. Beregn den procentvise bionedbrydning som følge af gas i headspace ved hjælp af ligning [10] og den samlede procentvise bionedbrydning ved hjælp af ligning [11]:

$$D_h = (m_h \,/\, m_v) \times 100 \quad \text{Ligning [10]}$$

$$D_t = (m_t \,/\, m_v) \times 100 \quad \text{Ligning [11]}$$

hvor:

D_h = bionedbrydning som følge af gas i headspace (%)

D_t = samlet bionedbrydning (%)

m_h, m_v og m_t er som defineret ovenfor.

Graden af primær bionedbrydning beregnes ud fra de (valgfrie) målinger af teststoffets koncentration ved begyndelsen og afslutningen af inkubationen ved hjælp af ligning [12]:

$$D_p = (1 - S_e \,/\, S_i) \times 100 \quad \text{Ligning [12]}$$

hvor:

D_p = primær nedbrydning af teststoffet (%)

S_i = teststoffets startkoncentration (mg/l)

S_e = teststofkoncentration ved afslutning (mg/l).

Viser analysemetoden signifikante teststofkoncentrationer i det uændrede anaerobe inokulum af slam, benyttes ligning [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ligning [13]}$$

hvor:

$D_p^{\,1}$ = korrigeret primær nedbrydning af teststoffet (%)

S_{ib} = »tilsyneladende« startkoncentration i teststof i blindkontroller (mg/l)

S_{eb} = »tilsyneladende« koncentration i teststof i blindkontroller ved afslutningen (mg/l).

Resultaternes validitet

50. Trykaflæsninger må kun bruges fra beholdere, som ikke viser lyserødfarvning (se punkt 33). Forurening med ilt minimeres gennem korrekt anaerob håndtering.

51. Det skal bemærkes, at testen er valid, hvis referencestoffet når et plateau, som repræsentere over 60 % bionedbrydning ([1]).

52. Hvis pH-værdien ved testens afslutning ligger over området 7 ± 1, og der har fundet en utilstrækkelig bionedbrydning sted, gentages testen med øget bufferkapacitet i mediet.

Hæmning af bionedbrydning

53. Gasproduktionen i beholdere, som indeholder både teststof og referencestof, skal som minimum være den samme som i beholdere, der kun indeholder referencestof. Ellers er det tegn på hæmning af gasproduktionen. I nogle tilfælde vil gasproduktionen i beholdere, der indeholder teststof uden referencestof, være lavere end i blindkontrollerne, hvilket er tegn på, at teststoffet er hæmmende.

Testrapport

54. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Teststoffet:

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) i teststoffet.

Testbetingelser:

— volumen af den fortyndede opløsning i rådnetanken (V_l) og headspace (V_h) i beholderen

— beskrivelse af testbeholderne, primære karakteristika for biogasmålingen (f.eks. type trykmåler) og kulstofanalysatoren

— anvendelse af teststof og referencestof på testsystemet: anvendt testkoncentration og eventuel anvendelse af opløsningsmidler

— oplysninger om anvendt inokulum: rensningsanlæggets navn, beskrivelse af kilden til det behandlede spildevand (f.eks. driftstemperatur, slamretentionstid, overvejende husholdningsspildevand osv.), koncentration, eventuelt nødvendige oplysninger til dokumentation af dette og oplysninger om eventuel forbehandling af inokulummet (f.eks. udrådning på forhånd, præeksponering)

— inkubationstemperatur

— antal replikater.

([1]) Dette bør genvurderes, hvis der er inkluderet adsorptive og uopløselige referencekemikalier.

▼M6

Resultater:

— pH- og IC-værdier ved testens afslutning

— teststoffets koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen, hvis der er foretaget en særlig måling

— alle målte data indsamlet under testen, blindprøve, referencestof og beholdere til hæmningskontrol, alt efter hvad der er relevant (f.eks. tryk i millibar, uorganisk kulstofkoncentration (mg/l)), i tabelform (målte data for headspace og væske registreres separat)

— statistisk databehandling, testvarighed og et diagram over bionedbrydningen af teststof og referencestof samt hæmningskontrol

— procentvis nedbrydning af teststof og referencestof

— årsager til eventuel afvisning af testresultaterne

— diskussion af resultater.

LITTERATUR

(1) Følgende kapitler i dette bilag:

C.4, Bestemmelse af let bionedbrydelighed

C.9, Biologisk nedbrydning — Zahn-Wellens Test

C.10, Simuleringsforsøg vedrørende aerob spildevandsrensning:

A: Aktiverede slamenheder, B: Biofilm

C.11, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) R.R. Birch, C. Biver, R. Campagna, W.E. Gledhill, U. Pagga, J. Steber, H. Reust og W.J. Bontinck, (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Også offentliggjort som ECETOC Technical Report No. 28, juni 1988).

(4) D.R. Shelton og J.M. Tiedje (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) W.F. Owen, D.C. Stuckey, J.B. Healy Jr., L.Y. Young og P.L. McCarty (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) J.B. Healy Jr. og L.Y. Young (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) W.E. Gledhill (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Arbejdsdokument. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) N. S. Battersby og V. Wilson (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) Den Internationale Standardiseringsorganisation (2003), ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

(13) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

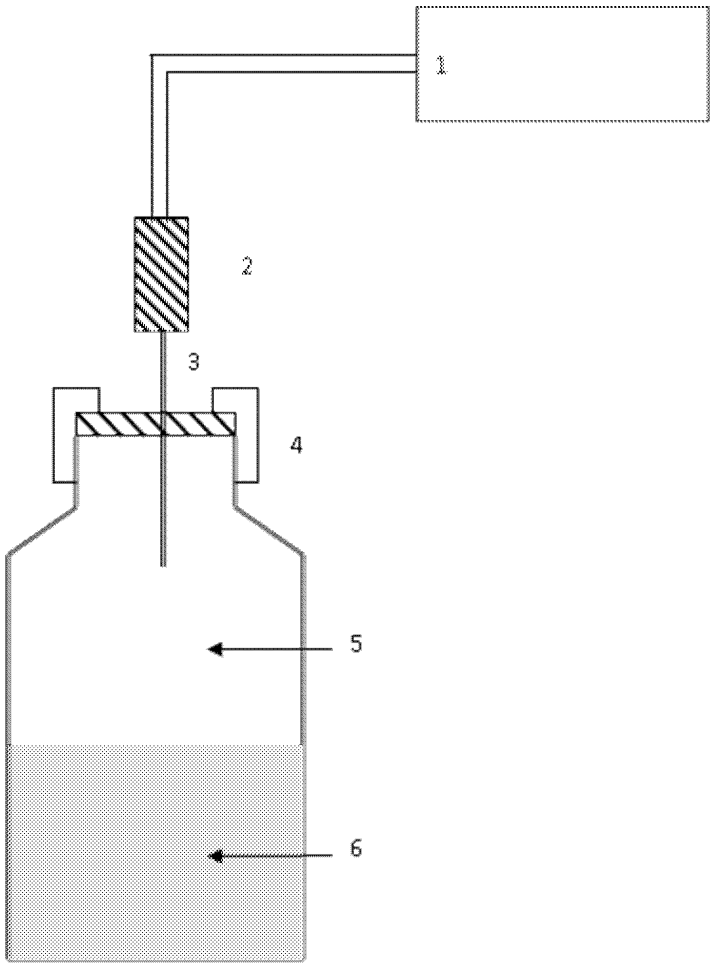
(14) U. Pagga og D.B. Beimborn (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) Den Internationale Standardiseringsorganisation (1997) ISO 11 923, Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Tillæg 1

Eksempel på et apparat til måling af biogasproduktion ved gastryk



Signaturforklaring:

1 — Trykmåler

2 — 3-Gastæt trevejsventil

3 — Kanyle

4 — Gastæt forsegling (crimplåg og septum)

5 — Headspace (V_h)

6 — Inokulum af udrådnet slam (V_l)

Testbeholdere i et miljø på 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Tillæg 2

Omstilling af trykmåleren

Trykmåleraflæsningerne kan sættes i forhold til gasvolumen ved hjælp af en standardkurve, som frembringes ved at indsprøjte en kendt mængde luft ved 35 °C ± 2 °C i serumflasker, der indeholder en mængde vand, som svarer til reaktionsblandingens, V_R:

— Fordel V_R ml aliquoter vand, holdt ved en temperatur på 35 °C ± 2 °C, i fem serumflasker. Forsegl flaskerne, og anbring dem i et vandbad ved 35 °C i en time med henblik på ækvilibrering.

— Tænd trykmåleren, lad den stabilisere sig, og indstil til nul.

— Indfør kanylen gennem låget på hver af flaskerne, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.

— Gentag denne procedure med de resterende flasker.

— Indsprøjt 1 ml luft med en temperatur på 35 °C ± 2 °C i hver flaske. Indfør nålen (på trykmåleren) gennem låget på en af flaskerne, og aflæs trykket, når det stabiliserer sig. Registrer trykket, åbn ventilen, og lad den være åben, indtil trykmåleren viser nul, og luk ventilen.

— Gentag denne procedure med de resterende flasker.

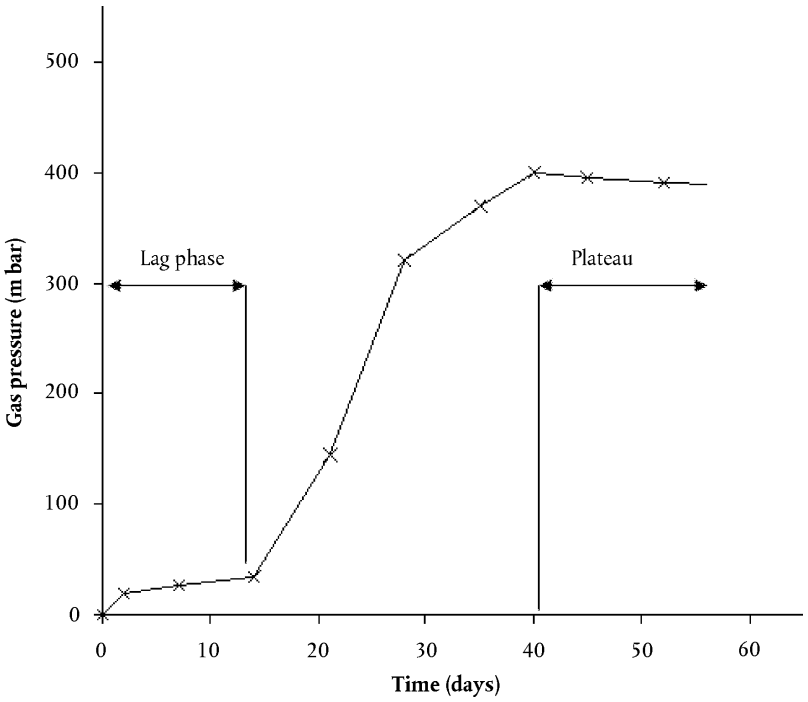
— Gentag hele proceduren med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml og 50 ml luft.

— Optegn en omregningskurve for tryk (Pa) mod indsprøjtet volumen gas, Vb (ml). Instrumentets respons er lineært i intervallet 0-70 000 Pa, og 0-50 ml gasproduktion.

▼**M6**

Tillæg 3

Eksempel på en nedbrydningskurve (stigning i akkumuleret nettotryk)



▼M6

Tillæg 4

Eksempel på resultatskemaer for anaerob bionedbrydningstest — resultatskema for teststoffet

Laboratorium: ..... Teststoffet: ..... Testnr.: .....

Testtemperatur: (°C) Headspacevolumen (V_h): .....(l) Væskevolumen (V_l): .....(l)

Kulstof i teststoffet $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Dag	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) middel-værdi (mbar)	p_4 (blindprøve) (mbar)	p_5 (blindprøve) (mbar)	p_6 (blindprøve) (mbar)	p (blindprøve) middelværdi (mbar)	p (netto) test – blind-prøve middelværdi (mbar)	Δp (netto) Kumuleret (mbar)	m_h headspace C ([2]) (mg)	D_h Bioned-bryde-lighed ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ Test (mg)	$C_{IC,\ 2}$ Test (mg)	$C_{IC,\ 3}$ Test (mg)	C_{IC} test middel (mg)	$C_{IC,\ 4}$ blindprøve (mg)	$C_{IC,\ 5}$ blindprøve (mg)	$C_{IC,\ 6}$ blindprøve (mg)	C_{IC} blindprøve middel (mg)	$C_{IC,\ netto}$ test – blind-prøve middelværdi (mg)	m_l væske C ([4]) (mg)	m_t C i alt ([5]) (mg)	D_t Bioned-bryde-lighed ([6]) (%)
IC (slut)												
pH (slut)												

([1]) Kulstofindhold i testbeholderen, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Kulstofindhold i headspace, m_h (mg) ved normal inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Bionedbrydning beregnet ud fra headspace-gas, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Kulstof i væske, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Samlet forgasset kulstof, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Samlet bionedbrydning, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratorium: ..... Referencestof: ..... Testnr.: .....

Testtemperatur:(°C): ..... Headspacevolumen (V_h): .....(l) Væskevolumen (V_l) (liter):.....

Kulstof i referencestof $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg):

Dag	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) middel-værdi (mbar)	p_4 (hæmn.) (mbar)	p_5 (hæmn.) (mbar)	p_6 (hæmn.) (mbar)	p (hæmn.) middel-værdi (mbar)	p (ref.) ref. — blind-prøve (mbar)	Δp (ref.) kumuleret (mbar)	m_h headspace C ([2]) (mg)	D_h Bioned-brydelighed ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} ref. middel (mg)	$C_{IC,\ 4}$ hæmn. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ hæmn. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ hæmn. (mg)	C_{IC} hæmn. middel (mg)	$C_{IC,\ netto}$ ref. — hæmn. (mg)	m_l væske C ([4]) (mg)	m_t C i alt ([5]) (mg)	D_t Bioned-brydelighed ([6]) (%)
IC (slut)												
pH (slut)												

([1]) Kulstofindhold i testbeholderen, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Kulstofindhold i headspace, m_h (mg) ved normal inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Bionedbrydning beregnet ud fra headspace-gas, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Kulstof i væske, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Samlet forgasset kulstof, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Samlet bionedbrydning, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. **Udvaskning i jordsøjler**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 312 (2004). Menneskeskabte kemikalier kan nå jorden direkte via bevidst anvendelse (f.eks. agrokemikalier) eller indirekte (f.eks. via spildevand → kloakslam → jord eller luft → våd-/tørdeposition). Ved risikovurdering af disse kemikalier er det vigtigt at anslå deres potentiale for omdannelse i jord og for bevægelse (udvaskning) til dybere jordlag og med tiden til grundvandet.

2. Der findes flere metoder til at måle kemikaliers potentiale for udvaskning i jord under kontrollerede laboratoriebetingelser, dvs. tyndtlagskromatografi i jord, tyktlagskromatografi i jord, jordsøjlekromatografi samt adsorptions-/desorptionsmålinger (1)(2). For ikkeioniserede kemikalier giver n-octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{ow}) mulighed for et tidligt skøn over deres adsorptions- og udvaskningspotentiale (3)(4)(5).

3. Den metode, som beskrives i denne testmetode, er baseret på jordsøjlekromatografi i forstyrret jord (se definition i tillæg 1). Der udføres to typer eksperimenter for at bestemme (i) testkemikaliets udvaskningspotentiale og ii) omdannelsesprodukternes udvaskningspotentiale (undersøgelse med ældede restprodukter) i jord under kontrollerede laboratoriebetingelser ([1]). Testmetoden er baseret på eksisterende metoder (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate, Italien, i 1995 (12), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test. Der blev også fremsat anbefalinger for prøvetagning samt håndtering og opbevaring af jordprøver til udvaskningsforsøg.

TESTMETODENS PRINCIP

5. Søjler fremstillet af passende inaktivt materiale (f.eks. glas, rustfrit stål, aluminium, teflon, PVC osv.) pakkes med jord og mættes og ækvilibreres efterfølgende med en »kunstig regn«-opløsning (se definition i tillæg 1) og lades dræne. Herefter behandles overfladen af hver jordsøjle med testkemikaliet og/eller med ældede restprodukter af testkemikaliet. Kunstig regn tilsættes jordsøjlerne, og perkolatet udtages. Efter udvaskningsprocessen fjernes jorden fra søjlerne og udskæres i et passende antal segmenter, alt efter hvilke oplysninger der ønskes fra undersøgelsen. Hvert jordsegment og perkolatet analyseres herefter for testkemikalie og eventuelt for omdannelsesprodukter eller andre kemikalier af interesse.

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

6. Testmetoden finder anvendelse på testkemikalier (umærkede eller radioaktivt mærkede: f.eks. ^{14}C), for hvilke der foreligger en tilstrækkeligt nøjagtig og følsom analysemetode. Testmetoden må ikke anvendes på kemikalier, som er flygtige fra jord og vand og således ikke forbliver i jord og/eller perkolat under denne testmetodes forsøgsbetingelser.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Umærkede eller radioaktivt mærkede testkemikalier kan bruges til at måle udvaskningsegenskaberne i jordsøjler. Der kræves radioaktivt mærket materiale til at undersøge udvaskning af omdannelsesprodukter (ældede restprodukter af testkemikaliet) og til bestemmelser af massebalance. ^{14}C-mærkning anbefales, men andre isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H og ^{32}P, kan ligeledes

([1]) Søjleudvaskningsundersøgelser med plantebeskyttelsesmidler kan give mobilitetsoplysninger om et testkemikalie og omdannelsesprodukterne heraf og kan supplere sorptionsundersøgelser for et parti.

▼M6

være nyttige. Mærket bør så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e). Testkemikaliets renhed skal være mindst 95 %.

8. De fleste kemikalier bør anvendes som enkeltstof. I forbindelse med aktive stoffer i plantebeskyttelsesmidler kan formulerede produkter dog anvendes til at undersøge udvaskning af det oprindelige teststof, men testningen af dem er især påkrævet, når blandingen kan påvirke frigivelseshastigheden (f.eks. granulerede formuleringer eller formuleringer med kontrolleret frigivelse). Med hensyn til blandingsspecifikke krav til testdesign kan det være hensigtsmæssigt at rådføre sig med tilsynsmyndigheden forud for gennemførelse af testen. I forbindelse med undersøgelser af ældede restkoncentrationer efter udvaskning bruges det rene oprindelige teststof.

9. Før udførelse af udvaskningstest i jordsøjler skal følgende oplysninger om testkemikaliet helst foreligge:

(1) vandopløselighed [testmetode A.6] (13)

(2) opløselighed i organiske opløsningsmidler

(3) damptryk [testmetode A.4] (13) og Henrys konstant

(4) n-octanol/vand-fordelingskoefficient [testmetode A.8 og A.24] (13)

(5) adsorptionskoefficient (K_d, K_f eller K_{OC}) [testmetode C.18 og/eller C.19] (13)

(6) hydrolyse [testmetode C.7] (13)

(7) dissociationskonstant (pK_a) [OECD TG 112] (25)

(8) aerob og anaerob omdannelse i jord [testmetode C.23] (13).

Bemærk: Den temperatur, hvorved disse målinger foretages, registreres i de respektive testrapporter.

10. Mængden af det testkemikalie, der er tilsat jordsøjlerne, skal være tilstrækkelig til, at der kan påvises mindst 0,5 % af den tilsatte dosis i et enkelt segment. For aktive kemikalier i plantebeskyttelsesmidler kan mængden af tilsat testkemikalie svare til den maksimale anbefalede dosis (enkel tilsætning).

11. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet og, hvis det er relevant, af dets omdannelsesprodukter i jord og perkolat. Analysens detektionsgrænse for testkemikaliet og væsentlige omdannelsesprodukter heraf (normalt mindst alle omdannelsesprodukter ≥ 10 % af den tilsatte dosis, som er observeret i undersøgelser af omdannelsesveje, men helst eventuelt relevante problematiske omdannelsesprodukter) skal også være kendt (se punkt 17).

▼M6

REFERENCEKEMIKALIER

12. Referencekemikalier med kendte udvaskningsegenskaber, såsom atrazin eller monuron, der kan betragtes som moderate udvaskningsmidler i marken, anvendes til at vurdere testkemikaliets relative mobilitet i jord (1)(8)(11). Et ikkesorberende og ikkenedbrydeligt polært referencekemikalie (f.eks. tritiumbromid, fluorescein og eosin) til at spore vands bevægelse i søjlen kan også være nyttigt til at bekræfte jordsøjlens hydrodynamiske egenskaber.

13. Standardkemikalier til analyse kan også være nyttige til at karakterisere og/eller identificere de omdannelsesprodukter, der påvises i jordsegmenter og perkolater ved kromatografiske, spektroskopiske eller andre relevante metoder.

DEFINITIONER OG ENHEDER

14. Se tillæg 1.

KVALITETSKRITERIER

Genfinding

15. Summen og procenttallene for testkemikaliet, der påvises i jordsegmenterne og søjleperkolatet efter udvaskning, angiver genfindingen for et udvaskningsforsøg. Der skulle gerne genfindes 90-110 % for radioaktivt mærkede kemikalier (11) og 70-110 % for ikkeradioaktivt mærkede kemikalier (8).

Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed

16. Repeterbarheden af analysemetoden til kvantitativ bestemmelse af testkemikalier og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse af det samme ekstrakt af et jordsegment eller et perkolat (se punkt 11).

17. Analysemetodens detektionsgrænse for testkemikaliet og for omdannelsesprodukterne må ikke være over 0,01 mg · kg^{-1} i hvert jordsegment eller perkolat (som testkemikalie) og ikke over 0,5 % af den tilsatte mængde i et enkelt segment. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal ligeledes angives.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Testsystem

18. Udvaskningssøjler (der eventuelt kan skæres i tværsnit) fremstillet af pasende inaktivt materiale (f.eks. glas, rustfrit stål, aluminium, teflon, PVC osv.) med en indvendig diameter på mindst 4 cm og en minimumshøjde på 35 cm bruges til testen. Søjlematerialer testes for potentielle vekselvirkninger med testkemikaliet og/eller omdannelsesprodukterne heraf. Eksempler på egnede søjler, der eventuelt kan skæres i tværsnit, vises i tillæg 2.

19. Ske, trykstempel og vibrationsapparat bruges til at fylde og pakke jordsøjlerne.

20. Til tilsætning af kunstig regn til jordsøjlerne kan der bruges stempel eller peristaltiske pumper, brusehoveder, Mariotteflasker eller simple tildrypningstragter.

▼M6

Laboratorieudstyr og kemikalier

21. Der kræves sædvanligt laboratorieudstyr, herunder specielt følgende:

(1) analyseapparatur som f.eks. GC, HPLC og TLC med passende detektionssystem til analyse af mærkede eller umærkede kemikalier eller til omvendt isotopfortyndingsmetode

(2) instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, mv.)

(3) væskescintillationstæller til radioaktivt mærket testkemikalie

(4) oxiderende stof til forbrænding af mærket materiale

(5) ekstraktionsapparat (f.eks. centrifugeglas til kold ekstraktion og Soxhlet-apparat til kontinuerlig ekstraktion med recirkulation

(6) udstyr til koncentrering af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper).

22. Anvendte kemikalier omfatter: organiske opløsningsmidler, analysekvalitet som acetone, methanol osv., scintillationsvæske, 0,01 M $CaCl_2$-opløsning i destilleret eller deioniseret vand (= kunstig regn).

Testkemikalie

23. Testkemikaliet opløses i vand (deioniseret eller destilleret), inden det tilføres til jordsøjlen. Hvis testkemikaliet er tungt opløseligt i vand, kan det enten tilføres som formuleret produkt (eventuelt efter at være blevet suspenderet eller emulgeret i vand) eller i et organisk opløsningsmiddel. Såfremt der bruges et organisk opløsningsmiddel, skal det begrænses til et minimum og afdampes fra jordsøjlens overflade, inden udvaskningen påbegyndes. Formuleringer i fast form, såsom granulater, anvendes i den faste form uden vand. For at sikre en bedre fordeling over jordsøjlens overflade kan det formulerede produkt blandes med en lille smule kvartssand (f.eks. 1 g) før tilsætning.

24. Mængden af det testkemikalie, der er tilsat jordsøjlerne, skal være tilstrækkelig til, at der kan påvises mindst 0,5 % af den tilsatte dosis i et enkelt segment. Til aktive kemikalier i plantebeskyttelsesmidler kan dette være baseret på den maksimale anbefalede dosis (enkel tilsætning) og skal til både oprindelig og ældet udvaskning stå i forhold til den anvendte jordsøjles overfladeareal ([1]).

Referencekemikalie

25. Der anvendes et referencekemikalie i udvaskningsforsøg (se punkt 12). Det tilføres jordsøjlens overflade på samme måde som testkemikaliet og med en passende dosis, der sikrer tilstrækkelig detektion enten som intern standard

([1]) Den mængde, der skal anvendes på cylindriske jordsøjler, kan beregnes ud fra følgende formel:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

hvor:

M = anvendt mængde pr. søjle [µg]

A = doseringsmængde [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = jordsøjlens diameter [cm]

π = 3,14

▼M6

sammen med testkemikaliet på den samme jordsøjle eller alene på en separat jordsøjle. Begge kemikalier skal helst testes på den samme søjle, undtagen hvis begge kemikalier er mærket ens.

Jordtyper

Valg af jordtype

26. Til udvaskningsundersøgelser med det oprindelige testkemikalie anvendes 3-4 jordtyper med varierende pH-værdi, organisk kulstofindhold og tekstur (12). Vejledning i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsforsøg er anført i tabel 1 nedenfor. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af kemikaliets mobilitet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Mindst tre jordtyper bør have en pH-værdi, hvor testkemikaliet er i sin mobile form.

Tabel 1

Vejledning i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsundersøgelser

Jordtype nr.	pH-værdi	Organisk kulstof %	Lerindhold %	Tekstur (*)
1	> 7,5	3,5-5,0	20 - 40	mellemler
2	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	siltblandet lerjord
3	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	lerjord
4	< 4,0-6,0 (§)	< 0,5-1,5 (§) (‡)	< 10-15 (§)	lerblandet sandjord
5	< 4,5	> 10 (#)	< 10	lerblandet sandjord/sand

(*) Ifølge FAO's og USDA's systemer (14).
§ De respektive variable skal helst vise værdier inden for de givne områder. Hvis der imidlertid opstår vanskeligheder med at finde egnet jordmateriale, accepteres værdier under det anførte minimum.
‡ Jordtyper med under 0,3 % organisk kulstof kan forstyrre korrelationen mellem organisk indhold og adsorption. Derfor anbefales det at bruge jordtyper med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.
# Jordtyper med et meget højt kulstofindhold (f.eks. > 10 %) er måske ikke juridisk acceptable, f.eks. med henblik på pesticidregistrering.

27. Andre jordtyper kan undertiden være nødvendige for at repræsentere køligere, tempererede og tropiske regioner. Foretrækker man andre jordtyper, bør de derfor være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variationer i egenskaber som dem, der er beskrevet i vejledningen i udvælgelse af jordtyper til udvaskningsundersøgelser (se tabel 1 ovenfor), også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.

28. Til udvaskningsundersøgelser med »ældede restkoncentrationer« bruges en jordtype (12). Den skal have et sandindhold > 70 % og et organisk kulstofindhold på 0,5-1,5 % (f.eks. jordtype nr. 4 i tabel 1). Det kan være nødvendigt at bruge flere jordtyper, hvis data om omdannelsesprodukterne er vigtige.

29. Alle jordtyper karakteriseres som minimum for tekstur [% sand, % silt, % ler ifølge FAO's og USDA's klassifikationssystemer (14)], pH-værdi, kationbytningskapacitet, organisk kulstofindhold, bulkdensitet (for forstyrret jord) og vandholdende evne. Måling af mikrobiel biomasse kræves kun for den jord, som bruges i ældnings-/inkubationsperioden, der går forud for forsøget med ældet udvaskning. Information om supplerende jordegenskaber (f.eks.

▼M6

jordklassifikation, lermineralogi, specifikt overfladeareal) kan være nyttig ved fortolkning af resultaterne af denne undersøgelse. Til bestemmelse af jordens karakteristika kan de anbefalede metoder i reference (15)(16)(17)(18)(19) bruges.

Indsamling og opbevaring af jordprøver

30. Jordprøverne tages fra det øverste lag (A-horisont) til en maksimal dybde af 20 cm. Rester af vegetation, makrofauna og sten fjernes. Jordprøverne (undtagen dem, der bruges til ældning af testkemikaliet) lufttørres ved stuetemperatur (helst ved 20-25 °C) Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordprøverne sigtes gennem en sigte på ≤ 2 mm. Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Før brug kan jordprøverne opbevares ved omgivelsestemperatur og holdes lufttørre (12). Der anbefales ingen grænse for opbevaringstid, men har jordprøverne været opbevaret i over tre år, bør de før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold og pH-værdi.

31. Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om de markarealer, hvor jordprøverne er indsamlet. Disse oplysninger omfatter nøjagtig beliggenhed [nøjagtigt defineret af UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiske koordinater], plantedække, behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder (12). Har jorden inden for de foregående fire år været behandlet med testkemikaliet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, må den ikke anvendes til udvaskningsundersøgelserne.

Testbetingelser:

32. I testperioden opbevares jordudvaskningssøjlerne i mørke ved omgivelsestemperatur, så længe denne temperatur holdes inden for et interval på ± 2 °C. Anbefalede temperaturer er 18-25 °C.

33. Kunstig regn (0,01 M $CaCl_2$) tilføres kontinuerligt til jordsøjlernes overflade med en dosis på 200 mm over en periode på 48 timer ([1]). Denne dosis svarer til en tilførsel på 251 ml for en søjle med en indvendig diameter på 4 cm. Hvis det er nødvendigt af hensyn til testen, kan andre doser kunstig regn og længere varighed endvidere bruges.

Gennemførelsen af testen

Udvaskning med oprindeligt testkemikalie

34. Mindst to udvaskningssøjler pakkes med ubehandlet, lufttørret og sigtet jord (< 2 mm) op til en højde på ca. 30 cm. For at opnå en ensartet pakning tilsættes jorden til søjlerne i små portioner med en ske og presses med et stempel under samtidig forsigtig vibration af søjlen, indtil toppen af jordsøjlen ikke synker mere. En ensartet pakning er nødvendig for at få reproducerbare resultater fra udvaskningssøjlerne. Se nærmere oplysninger om

([1]) Dette simulerer en ekstremt stor nedbørsmængde. Den gennemsnitlige årlige nedbørsmængde i f.eks. Centraleuropa er i størrelsesordenen 800-1 000 mm.

▼M6

søjlepakningsteknikker i reference (20)(21)(22). For at kontrollere at pakningsproceduren kan reproduceres, bestemmes den samlede vægt af den pakkede jord i søjlerne ([1]), idet vægten af de to søjler skal være den samme.

35. Efter pakningen vædes jordsøjlerne på forhånd med kunstig regn (0,01 M $CaCl_2$) fra top til bund for at fortrænge luften i jordporerne med vand. Derefter lades jordsøjlerne ækvilibrere, og det overskydende vand drænes bort ved tyngdekraft. Metoder til søjlemætning gennemgås i reference (23).

36. Herefter tilsættes testkemikaliet og/eller referencekemikaliet til jordsøjlerne (se også punkt 23-25). For at opnå en homogen fordeling tilføres opløsninger, suspensioner eller emulsioner af test- og/eller referencekemikaliet jævnt over jordsøjlernes overflade. Hvis indarbejdelse i jord anbefales for tilførsel af et testkemikalie, skal det blandes i en lille mængde (f.eks. 20 g) jord og tilsættes jordsøjlens overflade.

37. Jordsøjlernes overflader dækkes herefter af en sintret glasskive, glasperler, glasfiberfiltre eller et rundt filtrerpapir til at fordele den kunstige regn jævnt over hele overfladen og undgå at forstyrre jordoverfladen med regndråber. Jo større søjlediameteren er, jo større forsigtighed skal der udvises ved tilførsel af den kunstige regn til jordsøjlerne for at sikre en jævn fordeling af den kunstige regn over jordoverfladen. Så tilsættes den kunstige regn til jordsøjlerne dråbevis ved hjælp af et stempel eller en peristaltisk pumpe eller en tildrypningstragt. Perkolaterne skal helst indsamles i fraktioner, og deres respektive volumener registreres ([2]).

38. Efter udvaskning og dræning af søjlerne skæres jordsøjlerne i et passende antal segmenter, alt efter hvilke oplysninger der ønskes fra undersøgelsen, segmenterne ekstraheres med egnede opløsningsmidler eller opløsningsmiddelblandinger og analyseres for testkemikaliet og eventuelt for omdannelsesprodukter, for samlet radioaktivitet og for referencekemikaliet. Perkolater eller perkolatfraktioner analyseres direkte eller efter ekstraktion for de samme produkter. Når der anvendes et radioaktivt mærket testkemikalie, identificeres alle fraktioner, som indeholder ≥ 10 % af den anvendte radioaktivitet.

Udvaskning med ældede restkoncentrationer

39. Frisk jord (ikke tidligere lufttørret) behandles med en dosis svarende til jordsøjlernes overfladeareal (se punkt 24) af det radioaktivt mærkede testkemikalie og inkuberes under aerobe betingelser ifølge testmetode C.23 (13).

([1]) Herunder ses eksempler på massefylde for forstyrrede jordtyper:for en sandjord 1,66 g · ml^{-1}
for en lerblandet sandjord 1,58 g · ml^{-1}
for en lerjord 1,17 g · ml^{-1}
for en siltjord 1,11 g · ml^{-1}

([2]) Typiske perkolatvolumener ligger på 230-260 ml svarende til ca. 92-104 % af den samlede anvendte kunstige regn (251 ml), når der bruges jordsøjler på 4 cm i diameter og 30 cm længde.

▼M6

Inkubations- (ældnings-)perioden skal være lang nok til at producere væsentlige mængder af omdannelsesprodukter; en ældningsperiode på en halveringstid for testkemikaliet anbefales ([1]), men bør ikke overstige 120 dage. Forud for udvaskningen analyseres den ældede jord for testkemikaliet og omdannelsesprodukter heraf.

40. Udvaskningssøjlerne pakkes op til en højde på 28 cm med den samme jord (men lufttørret), som er brugt i ældningsforsøget, jf. punkt 34, og den samlede vægt af de pakkede jordsøjler bestemmes også. Jordsøjlerne vædes på forhånd, jf. punkt 35.

41. Testkemikaliet og omdannelsesprodukterne heraf tilføres herefter jordsøjlernes overflade i form af ældede jordrester (se punkt 39) som et 2 cm jordsegment. Jordsøjlernes samlede højde (ubehandlet jord + ældet jord) må helst ikke overstige 30 cm (se punkt 34).

42. Udvaskningen udføres som beskrevet i punkt 37.

43. Efter udvaskning analyseres jordsegmenter og perkolater som anført i punkt 38 for testkemikaliet, omdannelsesprodukterne heraf og ikkeekstraheret radioaktivitet. For at bestemme, hvor meget af den ældede restkoncentration der tilbageholdes i det øverste 2-cm-lag efter udvaskning, analyseres dette segment separat.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

44. Mængderne af testkemikalie, omdannelsesprodukter, ikkeekstraherbare stoffer og eventuelt referencekemikaliet anføres i % af anvendt startdosis for hvert jordsegment og hver perkolatfraktion. Der gives en grafisk fremstilling for hver søjle med indtegning af de procentdele, der påvises, som funktion af jorddybder.

45. Når et referencekemikalie medtages i disse søjleudvaskningsundersøgelser, kan udvaskningen af et kemikalie vurderes relativt under anvendelse af relative mobilitetsfaktorer (RMF, se definition i tillæg 3) (1)(11), hvilket giver mulighed for at sammenligne de udvaskningsdata for forskellige kemikalier, der opnås med forskellige jordtyper. Eksempler på RMF-værdier for forskellige plantebeskyttelsesmidler er anført i tillæg 3.

46. Skøn over K_{oc} (normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof) og K_{om} (normaliseret fordelingskoefficient for organisk kulstof) kan også fås fra søjleudvaskningsresultater ved at bruge den gennemsnitlige udvaskningsafstand eller fastslåede korrelationer mellem RMF og henholdsvis K_{om} og K_{oc} (4) eller anvende en simpel kromatografisk teori (24). Sidstnævnte metode bør dog bruges forsigtigt, især når man tager i betragtning, at udvaskningsprocessen ikke udelukkende involverer mættede flowbetingelser, men snarere umættede systemer.

([1]) Der kan dannes mere end et vigtigt omdannelsesprodukt i jord, som også kan vise sig på forskellige tidspunkter under et omdannelsesforsøg. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at foretage udvaskningsundersøgelser med ældede restkoncentrationer af forskellig alder.

▼M6

Fortolkning af resultaterne

47. De i denne metode beskrevne søjleudvaskningsundersøgelser giver mulighed for at bestemme testkemikaliets udvasknings- eller mobilitetspotentiale i jord (i den oprindelige udvaskningsundersøgelse) og/eller dets omdannelsesprodukters udvasknings- eller mobilitetspotentiale i jord (i undersøgelsen af ældede restkoncentrationer efter udvaskning). Disse test giver ikke en kvantitativ forudsigelse af udvaskningsegenskaber under feltbetingelser, men de kan bruges til at sammenligne et kemikalies »udvaskelighed« med andre, hvis udvaskningsegenskaber kan være kendt (24). På samme måde måler de ikke kvantitativt den procentdel af det tilførte kemikalie, som måske når grundvandet (11). Resultaterne af søjleudvaskningsundersøgelser kan dog være en hjælp til at afgøre, om der skal foretages supplerende tilnærmede feltforsøg eller rene feltforsøg for kemikalier, der udviser et højt mobilitetspotentiale i laboratorietest.

Testrapport

48. Rapporten skal indeholde:

Testkemikalie og (eventuelt) referencekemikalie:

— generisk navn, kemisk navn IUPAC- og CAS-nomenklatur), CAS-nummer, kemisk struktur (med angivelse af mærkets placering, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) af testkemikaliet

— for mærkede stoffer, radiokemisk renhed og specifik aktivitet (når det er relevant).

Prøvejordtyper:

— enkeltheder vedrørende indsamlingsstedet

— jordtypernes egenskaber, således pH, organisk kulstof- og lerindhold, tekstur og bulkdensitet (for forstyrret jord)

— mikrobiel aktivitet i jorden (kun for jord, der bruges til ældning af testkemikaliet)

— jordopbevaringsvarighed og -betingelser

Testbetingelser:

— dato for forsøgenes udførelse

— udvaskningssøjlernes længde og diameter

— jordsøjlernes samlede jordvægt

— mængde tilført testkemikalie og eventuelt referencekemikalie

— mængde, hyppighed og varighed af tilførslen af den kunstige regn

— forsøgsopstillingens temperatur

— antal gentagelser (mindst to)

— metoder til analyse af testkemikalie, omdannelsesprodukter og eventuelt referencekemikalie i de forskellige jordsegmenter og perkolater

— metoder til karakterisering og identifikation af omdannelsesprodukter i jordsegmenter og perkolater.

▼**M6**

Testresultater:

— tabeller med resultater angivet som koncentrationer og i % af den tilførte dosis til jordsegmenter og perkolater

— eventuelt massebalance

— perkolatvolumener

— udvaskningsafstande og eventuelt relative mobilitetsfaktorer

— grafisk optegning af % fundet i jordsegmenter i forhold til jordsegmentets dybde

— diskussion og fortolkning af resultater

LITTERATUR

(1) J.A. Guth, N. Burkhard og D.O. Eberle (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) M.H. Russel (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts og P.C. Kearney, Eds.). John Wiley & Sons, Inc.,

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter og D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) J.A. Guth (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Bilag I til Kommissionens direktiv 95/36/EF af 14. juli 1995 om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler, EFT L 172 af 22.7.1995, s. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch (red.).

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italien, 18.-20. januar 1995.

(13) Følgende kapitler i dette bilag:

Kapitel A.4, Damptryk

Kapitel A.6, Vandopløselighed

▼**M6**

Kapitel A.8, Fordelingskoefficient, rystekolbemetode

Kapitel A.24, Fordelingskoefficient, HPLC-metode

Kapitel C.7, Nedbrydning — abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH

Kapitel C.18, Adsorption/desorption med en batch-ligevægtmetode

Kapitel C.23, Aerob og anaerob omdannelse i jord

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller og D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Første udgave.

(18) E. Mückenhausen (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) F. Scheffer og P. Schachtschabel (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) J.B. Weber og T.F. Peeper (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) J.B. Weber, L.R. Swain, H.J. Strek og J.L. Sartori (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) C.D. Shackelford (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) J.W. Hamaker (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 4112, OECD, Paris.

▼M6

Tillæg 1

Definitioner og enheder

Restkoncentration i ældet jord: Testkemikalie og omdannelsesprodukter, der er til stede i jord efter tilførsel og efter en periode, som er lang nok til at muliggøre transport, adsorption, metabolisme og spredningsprocesser, så fordelingen og den kemiske karakter af noget af det tilførte kemikalie ændres (1).

Kunstig regn: 0,01 M $CaCl_2$ opløsning i destilleret eller deioniseret vand.

Gennemsnitlig udvaskningsafstand: Tværsnit af jordbund, hvor det akkumulerede genfundne kemikalie = 50 % af det samlede genfundne testkemikalie [normalt udvaskningsforsøg], eller (tværsnit af jordbund, hvor akkumuleret genfundet kemikalie = 50 % af det samlede genfundne testkemikalie) — ((tykkelsen af laget med ældet restkoncentration)/2) [undersøgelse af ældede restkoncentrationer efter udvaskning]

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Perkolat: Vandig fase, der trænger igennem en jordprofil eller en jordsøjle (1).

Udvaskning: Proces, hvorved et kemikalie bevæger sig ned gennem jordprofilen eller en jordsøjle (1).

Udvaskningsafstand: Dybeste jordsegment, hvor ≥ 0,5 % af det tilførte testkemikalie eller den ældede restkoncentration blev fundet efter udvaskningsprocessen (svarende til penetrationsdybde).

Detektionsgrænsen (LOD) og **kvantificeringsgrænsen (LOQ)**: Detektionsgrænsen (LOD) er den koncentration af et kemikalie, under hvilken kemikaliets identitet ikke kan skelnes fra analysebetingede artefakter. Kvantificeringsgrænsen (LOQ) er den koncentration af et kemikalie, under hvilken koncentrationen ikke kan bestemmes med acceptabel nøjagtighed.

RMF, Relativ mobilitetsfaktor: (testkemikaliets udvaskningsafstand (cm)) / (referencekemikaliets udvaskningsafstand (cm))

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode

Omdannelsesprodukt: Alle kemikalier hidrørende fra biotisk eller abiotisk omdannelsesreaktioner i testkemikaliet, herunder CO_2 og produkter, som er bundet i restkoncentrationer.

Jord: En blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold og bebos af små organismer (hovedsagelig mikroskopiske). Jord kan håndteres i to tilstande:

— uforstyrret, som den har udviklet sig med tiden, i karakteristiske lag af forskellige jordtyper

— forstyrret, som den sædvanligvis findes i agerjord, eller når der opgraves prøver til anvendelse i denne testmetode (2).

(1) P.T. Holland (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (vedtaget 12. maj 1981).

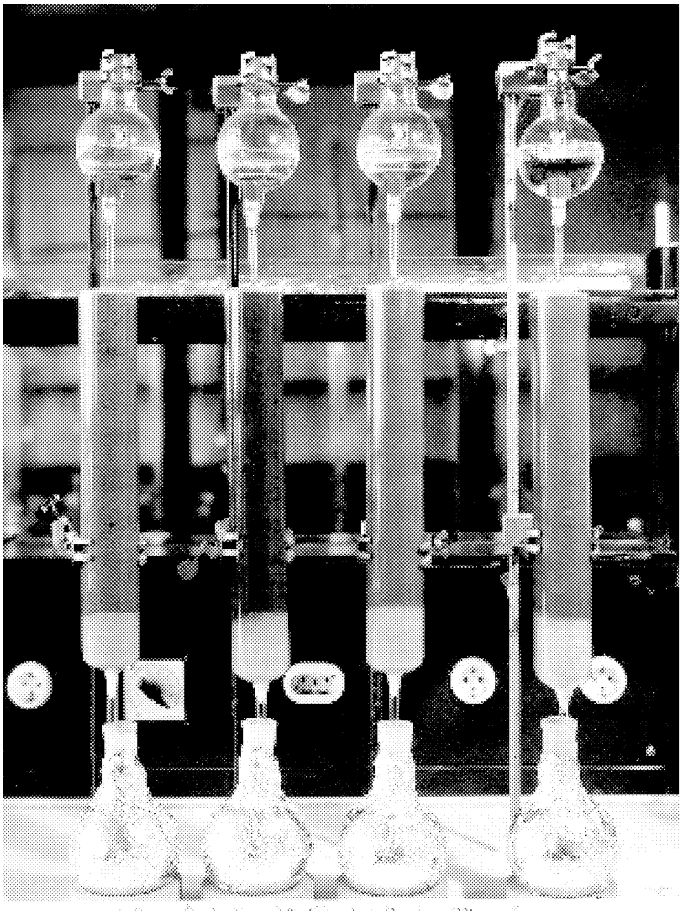
▼M6

Tillæg 2

Figur 1

Eksempel på udvaskningssøjler af glas, som ikke kan skæres i tværsnit

Med en længde på 35 cm og en indvendig diameter på 5 cm (1)



← Tildrypningstragter til tilførsel af kunstig regn

← Sintret glasskive for at undgå at forstyrre jordoverfladen og for at fordele den kunstige regn jævnt

← Glassøjle fyldt med testjord (ved testning af fotolabile produkter pakkes søjlerne i aluminiumsfolie)

← Lag kvartssand

← Glasuldsprop for at holde jorden i søjlen

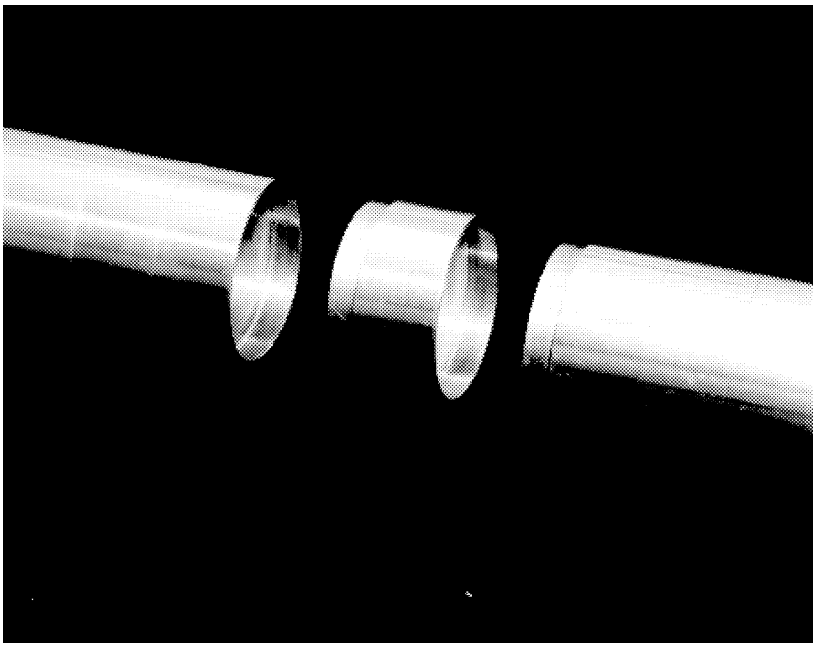
← Rundbundet kolbe til opsamling af perkolat. Pakket i aluminiumsfolie for at udelukke fotolyse

(1) N. Drescher (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Figur 2

Eksempel på en metalsøjle, der kan skæres i tværsnit, med en indvendig diameter på 4 cm (1)



(1) N. Burkhard, D.O. Eberle og J.A. Guth (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼**M6**

Tillæg 3

Eksempler på relative mobilitetsfaktorer (*) (RMF) for forskellige plantebeskyttelseskemikalier (1)(2) og tilsvarende mobilitetsklasser (+)

RMF-område	Kemikalie (RMF)	Mobilitetsklasse
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I immobil
0,15-0,8	Profenophos (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbuthylazin (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazin, (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II let mobil
0,8-1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazin (1,03), Simazin (1,04), Fluometuron (1,18)	III moderat mobil
1,3-2,5	Prometon (1,67), Cyanazin (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilat (1,98)	IV ret mobil
2,5-5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V mobil
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI meget mobil

(*) Den relative mobilitetsfaktor udledes som følger (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{testkemikaliets udvaskningsafstand(cm)}}{\text{referencekemikaliets udvaskningsafstand(cm)}}$$

(**) Referencekemikalie

\+ Andre systemer til at klassificere et kemikalies mobilitet i jord er baseret på R_f-værdier fra tyndtlagskromatografi i jord (4) og på K_{oc}-værdier (5)(6).

(1) J.A. Guth (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium »Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.« Canterbury, UK, 1.-3. juli 1985.

(2) J.A. Guth og W.D. Hörmann (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) C.I. Harris (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) C.S. Helling (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) P.J. McCall, D.A. Laskowski, R.L. Swann og H.J. Dishburger (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) J.M. Hollis (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. SKØN OVER EMISSIONER FRA KEMISK BESKYTTET TRÆ TIL MILJØET: LABORATORIEMETODE FOR TRÆVARER, DER ER I DIREKTE KONTAKT MED FERSKVAND ELLER HAVVAND

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 313 (2007). Emissionerne fra kemisk behandlet træ til miljøet skal bestemmes kvantitativt, så der kan foretages en miljørisikovurdering af det behandlede træ. I denne testmetode beskrives en laboratoriemetode til at foretage skøn over emissioner fra kemisk behandlet træ i to situationer, hvor der kan trænge emissioner ud i miljøet:

   — emissioner fra behandlet træ i kontakt med ferskvand. Emissioner fra det behandlede træs overflade kan trænge ud i vandet.

   — emissioner fra behandlet træ i kontakt med havvand. Emissioner fra det behandlede træs overflade kan trænge ud i havvandet.

2. Denne testmetode har til formål at teste emissioner fra træ og trævarer, som ikke er dækket og er i kontakt med ferskvand eller havvand. Brugsklasser benyttes internationalt til at kategorisere den biologiske fare, det behandlede træ udsættes for. Brugsklasser definerer også den situation, hvor den behandlede vare bruges, og bestemmer, hvilke delmiljøer (luft, vand, jord) der potentielt er i fare på grund af det kemisk beskyttede træ.

3. Testmetoden er en laboratorieprocedure til at udtage prøver fra vand, der har været brugt til at nedsænke beskyttet træ, med stigende tidsintervaller efter eksponeringen. Mængden af emissioner i prøven hænger sammen med træets overfladeareal og eksponeringens længde med henblik på at anslå en udstrømning i $mg/m^2/dag$. Udstrømningen (udvaskningshastigheden) efter perioder med stigende eksponering kan således anslås.

4. Emissionsmængden kan bruges i en miljørisikovurdering af det beskyttede træ.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Karakteren og sværhedsgraden af mekanismen for ferskvands udvaskning ved træoverfladen formodes ikke at være identisk med havvands udvaskning fra en træoverflade. For træbeskyttelsesmidler eller blandinger, som anvendes til behandling af træ, der bruges i nærheden af havvand, er en undersøgelse af udvaskning fra træ derfor nødvendig for havvand.

6. I tilfælde af træ behandlet med et træbeskyttelsesmiddel skal træet være repræsentativt for træ, som bruges erhvervsmæssigt. Det bør behandles i overensstemmelse med producentens instrukser og i henhold til relevante standarder og specifikationer. Parametrene for efterbehandling af træet før påbegyndelse af testen anføres.

7. De anvendte træprøver skal være repræsentative for de benyttede varer (f.eks. med hensyn til art, tæthed eller andre kendetegn).

▼M6

8. Testen kan foretages på træ, hvor der benyttes en gennemtrængningsproces eller påføring på overfladen, eller på behandlet træ, som har fået en supplerende obligatorisk overfladebehandling (f.eks. maling, der er påført som et krav for kommerciel brug).

9. Vandets sammensætning, mængde, pH-værdi og fysiske form er vigtig ved bestemmelse af kvantitet, indhold og art af emissionerne fra træet.

TESTMETODENS PRINCIP

10. Kemisk behandlede testemner af træ nedsænkes i vand. Vandet (prøven) optages og analyseres kemisk tilstrækkeligt mange gange i løbet af eksponeringsperioden til, at der kan foretages statistiske beregninger. Emissionsrater i $mg/m^2/dag$ beregnes på grundlag af analyseresultater. Prøvetagningsperioderne skal registreres. Test med ubehandlede prøver kan afbrydes, hvis der ikke påvises nogen baggrund i de første tre datapunkter.

11. Når ubehandlede træprøver medtages, giver det mulighed for at bestemme baggrundsniveauer for andre emissioner fra træ end det anvendte beskyttelsesmiddel.

KVALITETSKRITERIER

Nøjagtighed

12. Testmetodens nøjagtighed med hensyn til at anslå emission afhænger af, at testemnerne er repræsentative for erhvervsmæssigt behandlet træ, i hvilken grad vandet er repræsentativt for rigtigt vand, og på hvilken måde eksponeringen er repræsentativ for naturlige betingelser.

13. Analysemetodens nøjagtighed, præcision og repeterbarhed bør bestemmes, før testen udføres.

Reproducerbarhed

14. Tre vandprøver udtages og analyseres, og middelværdien bruges som emissionsværdi. Resultaternes reproducerbarhed i et laboratorium og mellem forskellige laboratorier afhænger af nedsænkningsbetingelserne og det træ, der bruges som testemner.

Acceptable resultatintervaller

15. Et resultatinterval fra denne test, hvor de øvre og nedre værdier adskiller sig med mindre end en størrelsesorden, er acceptabel.

TESTBETINGELSER:

Vand

16. Scenarier for udvaskning med ferskvand: Deioniseret vand (f.eks. ASTM D 1193 Type II) anbefales til brug i udvaskningstesten, når træ eksponeret for ferskvand skal vurderes. Vandtemperaturen skal være 20 °C +/– 2 °C, og den målte pH-værdi og vandtemperatur inkluderes i testrapporten. En analyse af prøver af det anvendte vand, som er taget før nedsænkningen af de behandlede prøver, giver mulighed for at anslå de analyserede kemikalier i vandet. Dette er en kontrol for at bestemme baggrundsniveauer for de kemikalier, som herefter analyseres kemisk.

▼M6

17. Scenarier for udvaskning med havvand: Det anbefales at bruge kunstigt havvand (f.eks. ASTM D 1141 Kunstigt havvand uden tungmetaller) i udvaskningstesten, når man skal vurdere træ eksponeret for havvand. Vandtemperaturen skal være 20 °C +/– 2 °C, og den målte pH-værdi og vandtemperatur inkluderes i testrapporten. En analyse af prøver af det anvendte vand, som er taget før nedsænkningen af de behandlede prøver, giver mulighed for at anslå de analyserede kemikalier i vandet. Dette er en kontrol til analysen af baggrundsniveauer for vigtige kemikalier.

Testemner af træ

18. Træsorterne bør være typiske for de træsorter, der bruges til effektivitetstestning af træbeskyttelsesmidler. De anbefalede sorter er *Pinus sylvestris L. (skovfyr), Pinus resinosa Ait. (harpiksfyr) eller Pinus spp (sumpfyr)*. Der kan foretages supplerende test med andre sorter.

19. Der anvendes lige nopret træ uden knaster. Materiale med synlig harpiks bør undgås. Træet skal være typisk for træ, der er tilgængeligt i handlen. Kilde, tæthed og antal årringe pr. 10 mm registreres.

20. Det anbefales at have testemner i sæt à fem træklodser af en størrelse ifølge EN 113 (25 mm × 50 mm × 15 mm) med længderetningen parallelt med træets fibre, skønt andre dimensioner, såsom 50 mm × 150 mm × 10 mm kan anvendes. Testemnet bør være helt nedsænket i vand. Testemnet bør bestå af 100 % splintved. Hvert emne mærkes entydigt, så det kan identificeres gennem hele testen.

21. Alle testemner bør være høvlet eller planskåret, og overfladerne må ikke være slebne.

22. Der skal mindst bruges fem sæt testemner til analyse: tre sæt emner behandles med træbeskyttelsesmiddel, et sæt emner er ubehandlet, og et sæt emner bruges til at anslå testemnernes fugtindhold efter ovntørring og før behandling. Der klargøres tilstrækkeligt mange testemner til, at der kan udvælges tre sæt emner, som ligger inden for 5 % af middelværdien for retention af træbeskyttelsesmiddel for det samlede antal testemner.

23. Alle testemner endeforsegles med et kemikalie, som forhindrer, at beskyttelsesmidlet trænger ind i emnernes endeflade, eller forhindrer udvaskning fra emnerne via endefladen. Ved påføring af endeforseglingen er det nødvendigt at skelne mellem emner, der anvendes til overfladebehandling og til gennemtrængningsprocesser. Der skal kun påføres endeforsegling før behandling i tilfælde af overfladebehandling.

24. Endefladen skal være åben for behandlinger via gennemtrængningsprocesserne. Derfor skal emnerne endeforsegles ved afslutningen af konditioneringsperioden. Emissionen skal kun anslås for overfladeområdet i længderetningen. Forseglingsmidler inspiceres og påføres om nødvendigt igen før indledning af udvaskningen og må ikke påføres igen, efter at udvaskningen er påbegyndt.

▼M6

Nedsænkningskar

25. Karret er fremstillet af et inaktivt materiale og er stort nok til at rumme fem EN113 træprøver i 500 ml vand, hvilket giver et forhold mellem overfladeareal og vandvolumen på 0,4 cm^2/ml.

Testopstilling

26. Testemnerne anbringes på et stativ, som giver mulighed for, at alle emnets eksponerede overflader kommer i kontakt med vandet.

FREMGANGSMÅDE FOR KEMISK BESKYTTELSE

Klargøring af de beskyttede testemner

27. De testemner af træ, der skal behandles med det kemiske beskyttelsesmiddel, som testes, behandles efter den for midlet anførte metode, som kan være en gennemtrængningsbehandling eller en overfladebehandling, hvilket kan ske ved dyp, spray eller børste.

Beskyttelsesmidler, der skal påføres ved en gennemtrængningsbehandling

28. Der fremstilles en opløsning af beskyttelsesmidlet, som vil sikre den anførte optagelse eller retention, når det påføres ved gennemtrængningsbehandlingen. Trætestemnet vejes og måles. Gennemtrængningsbehandlingen skal ske som anført for anvendelsen af beskyttelsesmidlet på træ til brug i brugsklasse 4 eller 5. Emnet vejes igen efter behandling, og beskyttelsesmidlets retention (kg/m^3) beregnes ud fra ligningen:

$$\frac{\text{Masse efter behandling (kg)} - \text{Masse før behandling (kg)}}{\text{Testemnevolumen } (m^3)} \times \frac{\text{Opløsningens koncentration (\% masse/masse)}}{100}$$

29. Bemærk, at der i denne test kan bruges industrielt behandlet tømmer (f.eks. ved vakuumtrykimprægnering). De anvendte fremgangsmåder registreres, og retentionen af materiale, der er behandlet på denne måde, skal analyseres og registreres.

Beskyttelsesmidler, der skal påføres ved overfladebehandling

30. Overfladebehandlingen omfatter dypning, påsprøjtning eller børstning af testemnerne. Processen og doseringen (f.eks. liter/m^2) bør være som anført for overfladebehandling med beskyttelsesmidlet.

31. Bemærk, at der også i denne test kan bruges industrielt behandlet tømmer. De anvendte fremgangsmåder registreres, og retentionen af materiale, der er behandlet på denne måde, skal analyseres og registreres.

Konditionering af testemnerne efter behandling

32. Efter behandling konditioneres de behandlede testemner i overensstemmelse med anbefalingerne fra leverandøren af testbeskyttelsesmidlet ifølge mærkekravene for beskyttelsesmidlet eller i overensstemmelse med kommerciel behandlingspraksis eller ifølge EN 252 Standard.

▼M6

Klargøring og udvælgelse af testemner

33. Efter konditioneringen efter behandling beregnes middelretentionen for gruppen af testemner, og tre repræsentative sæt emner med en retention inden for 5 % af middelværdien for gruppen udvælges tilfældigt til udvaskningsmålinger.

FREMGANGSMÅDE FOR EMISSIONSMÅLINGER FRA BESKYTTELSESMIDLET

Nedsænkningsmetode

34. Testemnerne vejes og nedsænkes efterfølgende fuldstændigt i vandet, og dato og tidspunkt registreres. Karret dækkes for at mindske fordampning.

35. Vandet udskiftes med følgende intervaller: 6 timer, 1 dag, 2 dage, 4 dage, 8 dage, 15 dage, 22 dage, 29 dage (bemærk: dette er samlede tider, ikke intervaltider). Tidspunkt og dato for vandudskiftningen og massen af vand, der opsamles fra karret, registreres.

36. Efter hver vandudskiftning opbevares en vandprøve, hvori sættet af testemner har været nedsænket, til senere kemisk analyse.

37. Prøvetagningsproceduren giver mulighed for at beregne profilen for mængden af emissioner i forhold til tid. Prøver opbevares under betingelser, der bevarer analysanden, f.eks. i et køleskab i mørke for at mindske mikrobiel vækst i prøven før analyse.

EMISSIONSMÅLINGER

Behandlede prøver

38. Opsamlet vand analyseres kemisk for det aktive stof og/eller relevante nedbrydnings-/omdannelsesprodukter efter behov.

Ubehandlede prøver

39. Opsamling af vand (prøven) i dette system og efterfølgende analyse af kemikalier, der var udvasket fra de ubehandlede træprøver, giver mulighed for at anslå beskyttelsesmidlets mulige emissionsrate fra ubehandlet træ. Opsamling og analyse af vandprøven efter stadigt længere perioders eksponering gør det muligt at anslå emissionsratens ændringshastighed i forhold til tid. Denne analyse er en kontrolprocedure for at bestemme testkemikaliets baggrundsniveauer i ubehandlet træ for at bekræfte, at det træ, der blev brugt som kilde til prøverne, ikke tidligere var blevet behandlet med beskyttelsesmidlet.

DATA OG RAPPORTERING

Kemiske analyser

40. Det opsamlede vand analyseres kemisk, og vandanalyseresultatet udtrykkes i passende enheder, f.eks. µg/l.

Rapportering af data

41. Alle resultater registreres Tillægget viser et eksempel på en foreslået registreringsformular til et sæt behandlede testemner og et oversigtsskema til beregning af middelemissionsværdierne over hvert prøvetagningsinterval.

42. Den daglige emissionsstrøm i mg/m^2/dag beregnes ved at tage middelværdien af de tre målinger fra de tre replikater og dividere dem med antal dages nedsænkning.

▼**M6**

Testrapport

43. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— navnet på leverandøren af det testede beskyttelsesmiddel

— det testede beskyttelsesmiddels specifikke og entydige navn eller kode

— handelsnavn eller generisk navn på den eller de aktive ingredienser med en generisk beskrivelse af hjælpestoffer (f.eks. hjælpeopløsningsmiddel, harpiks) og sammensætningen i % m/m af ingredienserne

— den relevante retention eller afsætning (i henholdsvis kg/m^3 eller l/m^2), der er anført for træ, som bruges i kontakt med vand

— den anvendte træsort med densitet og vækstrate i ringe pr. 10 mm

— afsætning eller retention af det testede beskyttelsesmiddel og den anvendte formel til at beregne retentionen udtrykt som l/m^2 eller kg/m^3

— metoden til påføring af beskyttelsesmidlet med angivelse af den anvendte behandlingsplan for en gennemtrængningsproces og påføringsmetoden, hvis der blev benyttet overfladebehandling

— datoen for anvendelse af beskyttelsesmidlet og et skøn over testemnernes fugtindhold udtrykt i procent

— anvendte konditioneringsprocedurer med angivelse af type, betingelser og varighed

— angivelse af anvendt endeforsegling og antal behandlinger

— angivelse af eventuel efterfølgende behandling af træet, f.eks. angivelse af leverandør, type, egenskaber og tilsætning af maling

— tidspunkt og dato for hver nedsænkning, den vandmængde, som blev brugt ved hver nedsænkning af testemnerne, og vandmængde absorberet af træet under nedsænkningen

— eventuel variation fra den beskrevne metode og eventuelle faktorer, der kan have påvirket resultaterne.

LITTERATUR

(1) Europæisk standard, EN 84 — 1997. Træbeskyttelse. Accelereret ældning af imprægneret træ inden biologisk prøvning. Udvaskning.

(2) Europæisk standard, EN 113/A1 — 2004. Træbeskyttelse. Prøvningsmetode til bestemmelse af beskyttelseseffektivitet mod trænedbrydende svampe (basidiomycetes). Bestemmelse af toksiske værdier.

(3) Europæisk standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) Europæisk standard, EN 335 — Del 1: 2006. Holdbarhed af træ og træbaserede produkter — Definition af brugsklasser — Del 1: Generelt.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Tillæg 1

Registreringsformular for testmetode

Skøn over emissioner fra kemisk beskyttet træ til miljøet: laboratoriemetode for trævarer, der er i direkte kontakt med ferskvand eller havvand

Testlaboratorium	

Træbeskyttelsesmiddel

Leverandør af beskyttelsesmidlet	
Beskyttelsesmidlets specifikke og entydige navn eller kode	
Beskyttelsesmidlets handelsnavn eller generiske navn	
Hjælpestoffer	
Relevant retention for træ brugt i kontakt med vand	

Anvendelse

Anvendelsesmetode	
Anvendelsesdato	
Formel anvendt til beregning af retentionen:	
Konditioneringsmetode	
Konditioneringens varighed	
Endeforsegling / antal behandlinger	
Efterbehandling	Hvis denne oplysning er relevant

Prøveemner

Træsorter	
Træets densitet	(minimum … middelværdi … maksimum)
Vækstrate (ringe pr. 10 mm)	(minimum … middelværdi … maksimum)
Vandindhold	

▼**M6**

Testopstillinger (*)	**Retention (f.eks. kg/m^3)**
Behandlet »x«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Behandlet »y«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Behandlet »z«	Middelværdi og standardafvigelse eller -område for 5 emner
Ubehandlet	
Variation i testmetodeparametre	f.eks. vandkvalitet, testemnernes dimensioner osv.

(*) x, y, z repræsenterer de tre kontraprøver

▼M6

Klokkeslæt	Vandud-skift-ning	Emnemasse		Vandoptagelse		Vandprøve				
		Behandlet (mid-del)	Ubehandlet	Behandlet (middel)	Ubehandlet		Testvand	x	y	z
	Dato:	g	g	g	g	nr.	pH	pH	pH	pH
Starttids-punkt										
6 t.						1				
24 t.						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼M6

Der udfærdiges separate tabeller for hver aktiv ingrediens

Klokkeslæt	Vandud-skift-ning	Analyseresultater															
		Ubehandlede emner			Behandlede emner												
		Koncentration af aktivt stof i vand mg/l	Udledt mængde mg/m^2	Emissions-rate $mg/m^2/d$	Koncentration af aktivt stof i vand				Udledt mængde				Emissionsrate			
					x	y	z	Middel	x	y	z	Middel	x	y	z	Middel
	Dato:				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 t.																
24 t.																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Bemærk: Da resultater fra ubehandlede prøver måske skal bruges til at korrigere emissionsrater fra behandlede prøver, anføres ubehandlede resultater først, og alle værdier for behandlede prøver vil være »korrigerede værdier«. Der kan også være en korrektion for den oprindelige vandanalyse.

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2400

▼**M6**

Tillæg 2

Definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M6

C.46. BIOAKKUMULERING I BENTISKE OLIGOCHAETER, DER LEVER I SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 315 (2008). Dyr, der lever i og af sedimenter, kan eksponeres for sedimentbundne stoffer (1). Blandt disse sedimentædere spiller akvatiske oligochaeter en vigtig rolle i bunden af de akvatiske systemer. De lever i sedimentet og repræsenterer ofte de hyppigst forekommende arter, især i habitater med miljøbetingelser, som er negative for andre dyr. Ved bioturbation af sedimentet og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af sådanne stoffer for andre organismer, f.eks. bentivore fisk. I modsætning til epibentiske organismer, graver endobentiske akvatiske oligochaeter sig ned i sedimentet og indtager sedimentpartikler under sedimentoverfladen. Af den grund eksponeres disse organismer for stoffer ad mange optagelsesveje, bl.a. direkte kontakt, indtagelse af forurenede sedimentpartikler, porevand og overliggende vand. Nogle arter af terrestriske oligochaeter, som i øjeblikket anvendes i forbindelse med økotoksikologiske test, er beskrevet i tillæg 6.

2. De parametre, der karakteriserer bioakkumuleringen af et stof, omfatter først og fremmest bioakkumuleringsfaktoren (BAF), hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e). Detaljerede definitioner på disse parametre kan ses i tillæg 1.

3. For at vurdere stoffers bioakkumuleringsevne generelt og undersøge bioakkumuleringen af stoffer, som deler sig i eller på sedimenter, er der behov for en rumspecifik testmetode (1)(2)(3)(4).

4. Denne testmetode har til formål at vurdere bioakkumulering af sedimenttilknyttede stoffer i endobentiske oligochaeter. Testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Brug af forurenet sediment skal simulere et sediment, der er kontamineret.

5. Denne metode er baseret på eksisterende testmetoder for sedimenttoksicitet og bioakkumulering, (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Andre nyttige dokumenter er: drøftelser og resultater af en international workshop (11) og resultatet af en international ringtest (12).

6. Denne test gælder for stabile, neutrale organiske stoffer, som normalt binder sig til sedimenter. Bioakkumulering af sedimentbundne, stabile metallo-organiske forbindelser kan også måles med denne metode (12). Den kan ikke anvendes på metaller og andre sporstoffer (11) uden modifikation af testdesignet med hensyn til substrat- og vandmængder og muligvis vævsprøvestørrelse.

FORUDSÆTNING OG INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

7. Der findes i øjeblikket kun nogle få indarbejdede kvantitative struktur-aktivitetsrelationer (QSAR) vedrørende bioakkumulering (14). Den mest udbredte relation er korrelationen mellem henholdsvis bioakkumulering og biokoncentration af stabile organiske stoffer og deres lipofilicitet (udtrykt som logaritmen af octanol/vand-fordelingskoefficienten (log K_{ow}), (se definition i tillæg 1), som er blevet udviklet til beskrivelse af en stofs fordeling mellem vand og fisk. Der er også fastslået korrelationer for sedimentmiljøet ved hjælp af denne relation (15)(16)(17)(18). Log K_{ow}-log BCF-korrelationen kan som en væsentlig QSAR være nyttig til et foreløbigt skøn over

▼M6

sedimentbundne stoffers bioakkumuleringspotentiale. BAF kan dog blive påvirket af testorganismens fedtindhold og sedimentets organiske kulstofindhold. Derfor kan den organiske kulstof-vandfordelingskoefficient (K_{oc}) måske også benyttes som en vigtig determinant for sedimentbundne organiske stoffers bioakkumulering.

8. Denne test kan anvendes på:

— stabile organiske stoffer med log K_{ow}-værdier mellem 3,0 og 6,0 (5)(19) og ekstremt lipofile stoffer med en log K_{ow} på mere end 6,0 (5)

— stoffer, som tilhører en klasse af organiske stoffer, der er kendt for deres bioakkumuleringspotentiale i levende organismer, f.eks. overfladeaktive stoffer eller stærkt adsorptive stoffer (f.eks. høj K_{oc}).

9. Oplysninger om testkemikaliet, såsom sikkerhedsforanstaltninger, korrekte oplagringsbetingelser og stabilitet samt analysemetoder, bør indhentes, før undersøgelsen indledes. Vejledning om stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes i (20) og (21). Før man udfører en test for bioakkumulering med akvatiske oligochaeter, skal der foreligge følgende oplysninger om testkemikaliet:

— generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed

— vandopløselighed [testmetode A.6 (22)]

— octanol/vand-fordelingskoefficient, K_{ow} [testmetode A.8 og A.24] (22)];

— sediment/vand-fordelingskoefficient, udtrykt som K_d eller K_{oc} [testmetode C.19 (22)]

— hydrolyse [testmetode C.7 (22)]

— fototransformation i vand (23)

— damptryk [testmetode A.4 (22)]

— let bionedbrydelighed [testmetode C.4 og C.29 (22)]

— overfladespænding [testmetode A.5 (22)]

— kritisk micellekoncentration (24).

Herudover vil følgende oplysninger være relevante — hvis de foreligger:

— bionedbrydning i vandmiljøet [testmetode C.24 og C.25 (22)]

— Henrys lovkonstant.

10. Radioaktivt mærkede testkemikalier kan gøre analyse af vand- og sedimentprøver samt biologiske prøver lettere og kan benyttes til at afgøre, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter. Den her beskrevne metode blev valideret i en international ringtest (12) for ^{14}C-mærkede stoffer. Hvis det samlede indhold af radioaktivt materiale måles, er bioakkumuleringsfaktoren (BAF) baseret på det oprindelige stof, inklusive eventuelt tilbageholdte nedbrydningsprodukter. Det er også

▼M6

muligt at kombinere en metabolismeundersøgelse med en bioakkumuleringsundersøgelse gennem analyse og kvantitativ bestemmelse af den procentvise andel af oprindeligt stof og nedbrydningsprodukterne heraf i prøver, som tages ved afslutningen af optagelsesfasen, eller når bioakkumuleringen er på sit højeste niveau. Under alle omstændigheder anbefales det, at BAF-beregningen baseres på koncentrationen af det oprindelige stof i organismerne og ikke kun på det samlede indhold af radioaktivt restmateriale.

11. Ud over testkemikaliets egenskaber er andre nødvendige oplysninger toksiciteten for de oligochaetarter, der skal anvendes i testen, såsom en gennemsnitlig dødelig dosis (LC_{50}) for den tid, der er nødvendig til optagelsesfasen, for at sikre, at valgte eksponeringskoncentrationer er meget lavere end de toksiske niveauer. Der anvendes fortrinsvis toksicitetsværdier fra langvarige forsøg vedrørende subletale effektparametre, hvis de foreligger (EC_{50}). Foreligger disse data ikke, kan en akut toksicitetstest under de samme betingelser som testbetingelserne for bioakkumulering eller toksicitetsdata om andre surrogatarter være nyttige oplysninger.

12. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testopløsningerne, i sedimentet og i det biologiske materiale, oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares, samt sikkerhedsdatablade for materialer. Teststoffets detektionsgrænser i vand, sediment og ormevæv bør også være kendt. Hvis der anvendes et radioaktivt mærket teststof, skal den specifikke radioaktivitet (dvs. Bq mol^{-1}), det radioaktivt mærkede atoms position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, også være kendt. Teststoffets specifikke radioaktivitet bør være så høj som muligt for at påvise så lave testkoncentrationer som muligt (11).

13. Oplysninger om kendetegnene for det sediment, der skal anvendes (f.eks. oprindelsen af sedimentet eller dets bestanddele, porevandets pH-værdi og ammoniakkoncentration (sediment fra marker), organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler og procent tørvægt), bør også være tilgængelige (6).

PRINCIP FOR TESTEN

14. Testen består af to faser: optagelsesfasen (eksponering) og elimineringsfasen (eftereksponering). I optagelsesfasen bliver ormene eksponeret for sediment tilsat teststoffet overhældt med rekonstitueret vand og eventuelt ækvilibreret (11). Grupper af kontrolorme holdes under identiske betingelser uden teststoffet.

15. Til elimineringsfasen overføres ormene til et sediment-vandsystem uden teststof. En elimineringsfase er nødvendig for at få oplysninger om, ved hvilken hastighed teststoffet udskilles af testorganismerne (19)(25). En elimineringsfase er altid påkrævet, medmindre optagelsen af teststoffet i eksponeringsfasen har været ubetydelig (f.eks. hvis der ikke er nogen statistisk forskel mellem koncentrationen af teststoffet i test- og kontrolormene). Hvis der ikke er nået en steady state i optagelsesfasen, kan bestemmelsen af kinetikken — BAF_k, hastighedskonstanten/-konstanterne for optagelse og elimination — ske ved hjælp af resultaterne af elimineringsfasen. Ændringer i koncentrationen af teststoffet i/på ormene overvåges i løbet af begge faser i testen.

16. I optagelsesfasen foretages der målinger, indtil BAF har nået et plateau eller en steady state. Som standard varer optagelsesfasen 28 dage. Erfaringer fra praksis har vist, at en 12-14-dages optagelsesfase er tilstrækkelig til, at flere stabile, neutrale organiske stoffer kan nå steady state (6)(8)(9).

▼M6

17. Hvis steady state imidlertid ikke nås inden for 28 dage, påbegyndes elimineringsfasen ved at overføre eksponerede oligochaeter til beholdere indeholdende det samme medium uden teststoffet. Elimineringsfasen afsluttes, enten når der er målt en koncentration på 10 % i ormene på optagelsesfasens dag 28 nås eller efter en maksimal varighed på 10 dage. Restkoncentrationen i ormene ved afslutningen af elimineringsfasen registreres som et supplerende endepunkt, f.eks. som ikkeelimineredе restkoncentrationer. Bioakkumuleringsfaktoren (BAF_{ss}) beregnes fortrinsvis både som forholdet mellem koncentrationen i ormene (C_a) og i sedimentet (C_s) ved tilsyneladende steady state og som en kinetisk bioakkumuleringsfaktor, BAF_K som forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e), idet kinetikken antages at være af første orden. Hvis der ikke er opnået steady state inden for 28 dage, beregnes BAF_K ud fra hastighedskonstanten/-konstanterne for optagelse og eliminering. Se beregning i tillæg 2. Hvis der ikke kan anvendes kinetik af første orden, må der benyttes mere komplekse modeller (tillæg 2 og reference (25)).

18. Hvis der ikke opnås steady state inden for 28 dage, kan optagelsesfasen eventuelt forlænges, så grupper af eksponerede orme om muligt kan underkastes yderligere målinger, indtil der steady state er nået. Sideløbende bør elimineringsfasen dog påbegyndes på optagelsesfasens dag 28.

19. Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for eliminering (eller konstanterne, hvis der anvendes mere komplekse modeller), den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_K) og så vidt muligt konfidensgrænserne for hver af disse parametre beregnes ud fra computerbaserede modelligninger (se modeller i tillæg 2). En models tilpasningsgrad kan bestemmes ud fra korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter tæt på en indicerer god tilpasning).

20. For at reducere variabiliteten i testresultater for organiske stoffer med høj lipofilicitet, bør bioakkumuleringsfaktorer yderligere udtrykkes i forhold til testorganismernes fedtindhold og til det organiske kulstofindhold (TOC) i sedimentet (biota-sedimentakkumuleringsfaktor eller BSAF i kg sediment TOC kg^{-1} fedtindhold i orm). Denne tilgang er baseret på erfaringer og teoretiske korrelationer for vandmiljøet, hvor der — for nogle kemiske klasser — er et klart forhold mellem et stofs bioakkumuleringsevne og dets lipofilicitet, som er blevet klart fastslået for fisk som modelorganismer (14)(25)(27). Der er også et forhold mellem testfiskens fedtindhold og den observerede bioakkumulering af disse stoffer. For bentiske organismer er der konstateret lignende korrelationer, f.eks. (15)(16)(17)(18). Hvis tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, kan testorganismernes fedtindhold bestemmes på det samme biologiske materiale som det, der benyttes til bestemmelse af koncentrationen af teststoffet. Det er dog praktisk i det mindste i starten eller — fortrinsvis — ved afslutningen af optagelsesfasen at benytte akklimatiserede kontroldyr til måling af fedtindholdet, som herefter kan bruges til at normalisere BAF-værdierne.

TESTENS VALIDITET

21. Testens validitet forudsætter følgende:

— Den akkumulerede dødelighed for ormene (kontroller og behandlinger) indtil testens afslutning må ikke overstige 20 % af det oprindelige antal.

— For at sikre maksimal eksponering bør det endvidere påvises, at ormene graver sig ned i sedimentet. Se yderligere oplysninger i punkt 28.

▼M6

BESKRIVELSE AF METODEN

Testarter

22. Flere arter af akvatiske oligochaeter kan anvendes til testen. De mest almindeligt anvendte arter er anført i tillæg 6.

23. Toksicitetstest (96 h, kun i vand) bør foretages med jævne mellemrum (f.eks. hver måned) med et toksisk referencestof som kaliumchlorid (KCl) eller kobbersulfat ($CuSO_4$) (1) for at påvise testdyrenes sundhedstilstand (1)(6). Foretages der ikke referencetoksicitetstest med jævne mellemrum, bør det parti organismer, som skal anvendes i en sedimentbioakkumuleringstest, kontrolleres under anvendelse af et toksisk referencestof. Måling af fedtindholdet kan også give nyttig information om dyrenes tilstand.

Dyrkning af testorganismer

24. For at have et tilstrækkeligt antal orme til at foretage bioakkumuleringstest kan det være nødvendigt at holde ormene i en permanent laboratoriekultur for enkeltarter. Laboratoriedyrkningsmetoder for udvalgte testarter er opsummeret i tillæg 6. Se nærmere oplysninger i reference (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparater

25. Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, som kan opløses eller absorbere teststofferne eller afgive andre stoffer og have en skadelig virkning på testorganismerne. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardbeholdere af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af forsøgsorm. Det bør undgås at bruge bløde plastslanger til administration af vand og luft. Der bør bruges polytetrafluorethylen, rustfrit stål og/eller glas til alt udstyr, der kommer i berøring med testmedierne. For stoffer med høj adsorptionskoefficient, såsom syntetiske pyrethroider, kan det være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug (5). For radioaktivt mærkede teststoffer og for flygtige stoffer bør stripning og udstrømning af det strippede testkemikalie omhyggeligt undgås. Udskillere (f.eks. gasvaskeflasker af glas) med egnede absorbenter benyttes til at tilbageholde eventuelle reststoffer, der fordamper fra testbeholderne (11).

Vand

26. Overliggende vand skal være af en sådan kvalitet, at testarten kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Rekonstitueret vand ifølge testmetode C.1 (25) bør bruges som overliggende vand i testene samt i laboratoriedyrkning af orme. Det har vist sig, at flere testarter kan overleve, vokse og formere sig i denne type vand (8), og der opnås maksimal standardisering af test- og kulturbetingelser. Vandet bør som minimum være karakteriseret ved pH, ledningsevne og hårdhed. En analyse af vandet for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger (tillæg 4).

27. Vandet bør være af konstant kvalitet under hele testen. Det overliggende vands pH-værdi bør ligge på 6-9. Den samlede hårdhed bør ligge på 90-400 mg $CaCO_3$ pr. liter ved påbegyndelse af testen (7). pH- og hårdhedsområder i det nævnte rekonstituerede vand er anført i testmetode C.1 (25).

▼M6

Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed. I tillæg 4 sammenfattes de øvrige kriterier for acceptabelt fortyndingsvand i henhold til OECD TG 210 (34).

Sediment

28. Sedimentet skal være af en sådan kvalitet, at testorganismerne kan overleve og helst forplante sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Ormene bør grave sig ned i sedimentet. Graveadfærd kan have indflydelse på eksponeringen og dermed på BAF. Derfor bør testorganismernes undgåelse af sediment eller graveadfærd registreres, hvis uklarhed i det overliggende vand giver mulighed for sådanne observationer. Ormene (kontrol- og behandlingsgrupper) bør grave sig ned i sedimentet inden for en periode på 24 timer efter tilsætning til testbeholderne. Såfremt der observeres manglende nedgravning eller undgåelse af sediment (f.eks. over 20 % i mere end halvdelen af optagelsesfasen), viser dette enten, at testbetingelserne ikke er hensigtsmæssige, eller at testorganismerne ikke er sunde, eller også at koncentrationen af teststoffet fremkalder denne adfærd. I så fald bør testen stoppes og gentages på bedre betingelser. Der kan opnås yderligere oplysninger om indtagelse af sediment ved anvendelse af de metoder, der er beskrevet i (35)(36), som indeholder nærmere oplysninger om indtagelse af sediment og partikelselektion i testorganismerne. Eventuel tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets på sedimentoverfladen, som indikerer, at ormene indtager sedimentet, registreres og tages i betragtning ved fortolkningen af testresultaterne med hensyn til eksponeringsveje.

29. Et syntetisk sediment baseret på den kunstige jord, der er beskrevet i testmetode C.8 (40), anbefales til brug i både test og laboratoriedyrkning af ormene (tillæg 5), da naturlige sedimenter af passende kvalitet måske ikke er tilgængelig hele året. Endvidere kan hjemmehørende organismer samt den mulige tilstedeværelse af mikroforurenere i naturlige sedimenter påvirke testen. Flere testarter kan overleve, vokse og formere sig i det kunstige sediment (8).

30. Det kunstige sediment bør som minimum karakteriseres ved bestanddelenes oprindelse, kornstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), organisk kulstofindhold (TOC), vandindhold og pH. Måling af redoxpotentiale er valgfri. Naturligt sediment fra uforurenede steder kan dog bruges som test- og/eller dyrkningssediment (1). Naturlige sedimenter karakteriseres ved mindst oprindelse (opsamlingssted), pH og ammoniak i porevandet, organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) samt vandindhold i procent (6). Såfremt der forventes ammoniakudvikling, bør det naturlige sediment inden tilsætning af teststoffet desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Ved udløbet af denne konditioneringsperiode, fjernes og kasseres det overliggende vand. En analyse af sedimentet eller dets bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger.

Fremstilling

31. Håndtering af naturlige sedimenter inden brug i laboratoriet er beskrevet i (1)(6)(44). Fremstilling af syntetisk sediment er beskrevet i tillæg 5.

▼M6

Opbevaring

32. Opbevaringen af naturlige sedimenter i laboratoriet bør være så kort som mulig. U.S. EPA (6) anbefaler en opbevaringsperiode på højst 8 uger ved 4 ± 2 °C i mørke. Der må ikke være headspace over sedimentet i opbevaringsbeholderne. Tillæg 5 indeholder anbefalinger for opbevaring af syntetisk sediment.

Tilførsel af teststoffet

33. Testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Spiking-proceduren indebærer, at en eller flere af sedimentets bestanddele coates med teststoffet. F.eks. kan kvartssandet eller en del af det (f.eks. 10 g kvartssand pr. testbeholder) gennemvædes med en opløsning af teststoffet i et egnet opløsningsmiddel, som langsomt inddampes til tørhed. Den overfladebehandlede andel blandes derefter med det våde sediment. Den mængde sand, der findes i teststof- og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles, dvs. sedimentet skal således fremstilles med mindre sand (6).

34. Med et naturligt sediment kan teststoffet tilsættes ved spiking af en tørret del af sedimentet som beskrevet ovenfor for det kunstige sediment eller ved omrøring af teststoffet i det våde sediment med efterfølgende afdampning af eventuelt opløsningsmiddel. Egnede opløsningsmidler til spiking af vådt sediment er ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol (5)(34). Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af teststoffet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af en egnet opløselighedsfremmer. Supplerende vejledning om spiking-procedurer findes i Environment Canada (1995) (41). Det sikres, at det teststof, der tilsættes til sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Replikerede delprøver af det spikede sediment bør analyseres for at kontrollere koncentrationerne af teststoffet i sedimentet og bestemme homogenitetsgraden i testkemikaliets fordeling.

35. Når det spikede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at teststoffet fordeler sig mellem sedimentet og den vandige fase. Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og stof og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger) (28)(42). I denne test afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer til syv dage anbefales. Afhængigt af forsøgets formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan det spikede sediment ækvilibreres eller ældes i længere tid (11).

UDFØRELSE AF TESTEN

Indledende test

36. Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment med henblik på at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af optagelses- og elimineringsfasen.

▼M6

Ormenes adfærd, f.eks. undgåelse af sediment, dvs. at ormene slipper ud af sedimentet, hvilket som kan skyldes teststoffet og/eller selve sedimentet, observeres og registreres under en indledende test. Undgåelse af sediment kan også bruges som en subletal parameter i en indledende test til at anslå, hvilke(n) koncentration(er) af testkemikaliet der skal anvendes i en bioakkumuleringstest.

Eksponeringsbetingelser

Optagelsesfasens længde

37. Testorganismerne eksponeres for teststoffet i løbet af optagelsesfasen. Den første prøve tages 4-24 timer efter optagelsesfasens begyndelse. Optagelsesfasen bør vare op til 28 dage (1)(6)(11), medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Der opstår steady state, når: (i) en afbildning af bioakkumuleringsfaktorerne i hver prøvetagningsperiode mod tid er parallel med tidsaksen, (ii) tre successive analyser af BAF foretaget på prøver udtaget med intervaller på mindst to dage og højst varierer ± 20 % fra hinanden, og (iii) der ikke er væsentlige forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder (baseret på statistiske sammenligninger, f.eks. variansanalyse og regressionsanalyse). Hvis steady state ikke er opnået inden 28 dage, kan optagelsesfasen afsluttes ved at påbegynde elimineringsfasen, og BAF_K kan beregnes ud fra hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering (se også punkt 16-18).

Elimineringsfasens længde

38. Den første prøve udtages 4-24 timer efter starten af elimineringsfasen, da der i den første periode kan ske hurtige ændringer i vævsrester. Det anbefales at afslutte elimineringsfasen, enten når koncentrationen af teststoffet er under 10 % af steady-state-koncentrationen eller efter højst 10 dage. Restniveauet i ormene ved afslutningen af elimineringsfasen registreres som et supplerende endepunkt. Periodens længde kan f.eks. bestemmes af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i ormene er højere end detektionsgrænsen.

Testorganismer

Antal testorme

39. Antallet af orme pr. prøve skal give en ormevævsmasse, der sikrer, at massen af teststof pr. prøve i henholdsvis begyndelsen af optagelsesfasen og ved afslutningen af elimineringsfasen er væsentligt højere end detektionsgrænsen for teststoffet i biologisk materiale. På de nævnte trin i optagelses- og elimineringsfaserne er koncentrationen i testorganismerne normalt relativt lav (6)(8)(18). Eftersom den individuelle vægt hos mange arter af akvatiske oligochaeter er meget lav (5-10 mg vådvægt pr. individ for Lumbriculus variegatus og Tubifex tubifex), kan ormene i en given replikattestbeholder samles med henblik på vejning og analyse for testkemikalie. For testarter med højere individuel vægt (f.eks. Branchiura sowerbyi) kan der anvendes replikater, som indeholder et individ, men i disse tilfælde bør antallet af replikater øges til fem pr. prøvetagningssted (11). Det skal dog bemærkes, at B. sowerbyi ikke var med i ringtesten (12) og derfor ikke anbefales som en foretrukken art til metoden.

40. Orme af lignende størrelse bør anvendes (for L. variegatus se tillæg 6). De bør komme fra samme kilde og bør være voksne eller store dyr af samme aldersklasse (se tillæg 6). En organismes vægt og alder kan have en væsentlig virkning på BAF-værdierne (f.eks. på grund af forskelligt fedtindhold og/eller tilstedeværelse af æg). Disse parametre registreres nøjagtigt. For at måle middelvægten (våd og tør) vejes en delprøve af orme før påbegyndelse af testen.

▼M6

41. Med Tubifex tubifex og Lumbriculus variegatus, forventes formering i testperioden. Manglende formering i en bioakkumuleringstest registreres og tages i betragtning ved fortolkning af testresultaterne.

Belastning

42. Høje forhold mellem sediment og orme og mellem vand og orme bør benyttes til at minimere reduktionen af teststoffets koncentration i sedimentet i optagelsesfasen og undgå fald i koncentrationen af opløst ilt. Den valgte belastningsgrad bør også svare til den valgte arts naturligt forekommende populationstæthed (43). F.eks. anbefales for Tubifex tubifex en belastningsgrad på 1-4 mg ormevæv (vådvægt) pr. gram vådt sediment (8)(11). I henhold til reference (1) og (6) anbefales en belastningsgrad på ≤ 1 g tørvægt ormevæv pr. 50 g organisk kulstof i sedimentet for L. variegatus.

43. De orme, der skal bruges i en test, fjernes fra kulturen ved at sigte dyrkningssedimentet. Dyrene (voksne eller store orme uden tegn på nylig fragmentering) flyttes til glasskåle (f.eks. petriskåle), som indeholder rent vand. Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne, bør en akklimatiseringsfase på 24 timer være tilstrækkelig. Inden vejning fjernes overskydende vand fra ormene. Dette kan ske ved forsigtigt at anbringe ormene på et stykke forhåndsfugtet filtrerpapir. Det kan ikke anbefales at bruge absorberende papir til at tørre ormene, da dette kan stresse eller skade dem. Brunson et al. (1998) anbefaler at anvende ikkeduppede orme på ca. 1,33 gange målbiomassen. Disse ekstra 33 % svarer til forskellen mellem duppede og ikkeduppede orme (28).

44. Ved starten af optagelsesfasen (testens dag 0) fjernes testorganismerne fra akklimatiseringsbeholderen og fordeles tilfældigt til beholdere (f.eks. petriskåle), der indeholder rekonstitueret vand, idet der tilsættes grupper på to orme til hver beholder, indtil hver beholder indeholder 10 orme. Hver af disse grupper af orme overføres herefter tilfældigt til separate testbeholdere, f.eks. ved hjælp af en blød ståltang. Testbeholderne inkuberes efterfølgende under testbetingelser.

Fodring

45. I lyset af det kunstige sediments lave næringsstofindhold bør sedimentet justeres med en fødekilde. For ikke at undervurdere eksponeringen af testorganismerne, f.eks. ved selektivt at fodre med ikkeforurenet føde, bør den føde, som er nødvendig for testorganismernes formering og vækst, tilsættes til sedimentet en gang før eller under tilsætningen af testkemikaliet (se tillæg 5).

Sediment-vandforhold

46. Det anbefalede sediment-vandforhold er 1:4 (45). Dette forhold anses for egnet til at opretholde iltkoncentrationerne på passende niveauer og undgå opbygningen af ammoniak i det overliggende vand. Iltindholdet i det overliggende vand bør fastholdes på en mætning på ≥ 40 %. Det overliggende vand i testbeholderne beluftes forsigtigt (f.eks. 2-4 bobler pr. sekund) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt ca. 2 cm over sedimentoverfladen med henblik på at minimere forstyrrelser af sedimentet.

▼M6

Lys og temperatur

47. Lysperioden i kulturen og testen er 16 timer. Lysintensiteten i testområder holdes på omkring 500-1 000 lx. Temperaturen bør være 20 ± 2 °C i hele testen.

Testkoncentrationer

48. En testkoncentration (så lav som muligt) bruges til at bestemme optagelseskinetikken, men der kan bruges en anden (højere) koncentration (f.eks. (46)). I så fald udtages og analyseres der prøver ved steady state eller efter 28 dage for at bekræfte den BAF-værdi, som blev målt ved den lavere koncentration (11). Den højere koncentration vælges, så negative virkninger kan udelukkes (f.eks. ved at vælge ca. 1 % af den lavest kendte koncentration med kronisk virkning EC_x som afledt af relevante kroniske toksicitetsforsøg). Den laveste testkoncentration bør være betydeligt højere end detektionsgrænsen i sediment og biologiske prøver ved den anvendte analysemetode. Hvis teststoffets effektkoncentration ligger tæt på detektionsgrænsen, anbefales det at bruge et radioaktivt mærket teststof med høj specifik radioaktivitet.

Behandlings- og kontrolreplikater

49. Der bør som minimum være tre behandlingsreplikater til kinetiske målinger pr. prøvetagningssted (11) i hele optagelses- og elimineringsfasen. Supplerende replikater bruges f.eks. til valgfrie supplerende prøvetagningsdatoer. Til elimineringsfasen klargøres et tilsvarende antal replikater med ikke-spiket sediment og overliggende vand, så de behandlede orme ved afslutningen af optagelsesfasen kan overføres fra de pågældende behandlingsbeholdere til beholdere uden behandling. Det samlede antal behandlingsreplikater bør være tilstrækkeligt til både optagelses- og elimineringsfasen.

50. Alternativt kan orme, der er valgt til prøvetagning i elimineringsfasen, eksponeres i en stor beholder med spiket sediment fra samme parti som det, der blev brugt til optagelseskinetik. Det påvises, at testbetingelserne (f.eks. sedimentdybde, sediment-vandforhold, belastning, temperatur, vandkvalitet) kan sammenlignes med de replikater, som er valgt til optagelsesfasen. Ved afslutningen af optagelsesfasen udtages vand-, sediment- og ormeprøver fra denne beholder til analyse, og et tilstrækkeligt antal store orme, som ikke viser tegn på nylig fragmentering, fjernes forsigtigt og overføres til de replikater, der er klargjort til elimineringsfasen (f.eks. 10 organismer pr. replikatbeholder).

51. Hvis der ikke anvendes andet opløsningsmiddel end vand, skal der sikres mindst ni replikater af en negativ kontrol (mindst tre udtaget ved start, tre ved afslutning af optagelsen og tre ved afslutning af elimineringen) til biologisk analyse og baggrundsanalyse. Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer ved tilsætning af teststoffet, foretages der en kontrol med opløsningsmiddel (mindst tre replikater udtages ved start, tre ved afslutning af optagelsesfasen og tre ved afslutning af elimineringsfasen). I så fald sikres mindst fire replikater af en negativ kontrol (uden opløsningsmiddel) til prøveudtagning ved afslutning af optagelsesfasen. Disse replikater kan sammenlignes biologisk med opløsningsmiddelkontrollen for at få oplysninger om opløsningsmidlets mulige indvirkning på testorganismerne. Tillæg 3 indeholder nærmere oplysninger.

▼M6

Hyppighed af målinger af vandkvaliteten

52. Som minimum måles følgende vandkvalitetsparametre i det overliggende vand i optagelses- og elimineringsfasen:

Temperatur	i en beholder på hvert behandlingsniveau pr. prøvetagningsdato og i en kontrolbeholder en gang om ugen og ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden. Temperaturen i det omgivende medium (omgivende luft eller vandbad) eller i en repræsentativ testbeholder kan også registreres f.eks. kontinuerligt eller en gang i timen
Indhold af opløst ilt	i en beholder på hvert behandlingsniveau og i en kontrolbeholder pr. prøvetagningsdato udtrykt i mg/l og % ASV (luftmætningsværdi)
Luftforsyning	kontrolleres mindst en gang om dagen (hverdage) og justeres eventuelt
pH	i en behandlingsbeholder for hvert behandlingsniveau pr. prøvetagningsdato og i en kontrolbeholder en gang om ugen og ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden
Vandets samlede hårdhed	i mindst en behandlingsbeholder og en kontroltestbeholder ved begyndelsen og afslutningen af optagelses og elimineringsperioden udtrykt i mg/l $CaCO_3$
Samlet ammoniakindhold	i mindst en behandlingsbeholder og en kontroltestbeholder ved begyndelsen og afslutningen af optagelses- og elimineringsperioden udtrykt i mg/l NH_4^+ eller NH_3 eller samlet ammoniak-N.

Prøveudtagning og analyse af orme, sediment og vand

Prøvetagningsplan

53. Eksempler på prøvetagningsplaner for en 28-dages optagelsesfase og en 10-dages elimineringsfase findes i tillæg 3.

54. Der udtages prøver af vand og sediment fra testbeholderne med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både inden ormene tilsættes og under optagelses- og elimineringsfasen. Under testen bestemmes koncentrationerne af teststof i orme, sediment og vand for at overvåge fordelingen af teststoffet i testsystemets delmiljøer.

55. Udtag prøver af orme, sediment og vand mindst seks gange i optagelses- og elimineringsfasen.

56. Fortsæt prøvetagningen, indtil der er fastslået et plateau (steady state) (se tillæg 1) eller i 28 dage. Er plateauet ikke nået inden for 28 dage, påbegyndes elimineringsfasen. Ved påbegyndelse af elimineringsfasen overføres de udvalgte orme til replikatbeholderne, der indeholder ubehandlet sediment og vand (se også punkt 17-18).

Udtagning og klargøring af prøver

57. Udtag vandprøver ved at dekantere, suge eller pipettere et tilstrækkeligt volumen til at måle mængden af teststoffet i prøven.

58. Det resterende overliggende vand dekanteres eller suges omhyggeligt fra testbeholderen/-beholderne. Sedimentprøver udtages forsigtigt, så der forårsages minimal forstyrrelse af ormene.

▼M6

59. Fjern alle orme fra testreplikatet på prøvetagningstidspunktet, f.eks. ved at suspendere sedimentet med overliggende vand og sprede indholdet af hvert replikat på en lav bakke og udtage ormene ved hjælp af en blød ståltang. Skyl dem hurtigt med vand i et lavt glas eller en stålbakke. Fjern overskydende vand. Overfør forsigtigt ormene til en på forhånd vejet beholder, og vej dem. Afliv ormene ved frysning (f.eks. ≤ – 18 °C). Tilstedeværelsen og antallet af kokoner og/eller afkom registreres.

60. Generelt skal ormene vejes og aflives umiddelbart efter prøvetagningen uden en tarmtømningsfase, så der kan fås et konservativt BAF, der omfatter forurenet tarmindhold, og for at undgå tab af restkoncentrationer i kroppen under en eventuel tarmtømningsperiode kun i vand (8). Kemikalier med log K_{ow} over 5 forventes ikke at blive elimineret væsentligt i en eventuel tarmtømningsperiode kun i vand, mens kemikalier med log Kow under 4 kan gå tabt i betydelige mængder (47).

61. I elimineringsfasen tømmer ormene deres tarm i rent sediment. Dette betyder, at målinger umiddelbart før elimineringsfasen omfatter forurenet tarmsediment, mens størstedelen af det forurenede tarmindhold efter de første 4-24 timer af elimineringsfasen antages at blive udskiftet med rent sediment (11)(47). Koncentrationen i ormene i denne prøve kan herefter betragtes som vævskoncentrationen efter tarmtømning. For at tage højde for det uforurenede sediments fortynding af teststofkoncentrationen i løbet af elimineringsfasen kan vægten af tarmindholdet estimeres ud fra forholdet mellem ormenes vådvægt/ormenes askevægt eller ormenes tørvægt/ormenes askevægt.

62. Hvis formålet med et bestemt forsøg er at måle biotilgængeligheden og de sande restkoncentrationer i testorganismernes væv, bør mindst en delprøve af behandlede organismer (f.eks. fra tre supplerende replikatbeholdere) herefter udtages under steady state, vejes, udtømmes i rent vand i en periode på seks timer (47) og vejes igen før analyse. Data om ormevægt og kropskoncentration fra denne delprøve kan efterfølgende sammenlignes med værdier opnået fra ikkeudtømte orm. De orme, som er udvalgt til måling af elimination, udtømmes ikke, før de overføres til rent sediment, for at minimere den ekstra stress for dyrene.

63. Vand-, sediment- og ormeprøver skal helst analyseres straks (dvs. inden for 1-2 dage) efter fjernelse, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og elimineringshastigheder. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau er nået.

64. Foretages analyserne ikke med det samme, bør prøverne opbevares hensigtsmæssigt. Der skal indhentes oplysninger om stabilitet og passende opbevaringsbetingelser for det specifikke teststof (f.eks. opbevaringstid og -temperaur, ekstraktionsfremgangsmåder osv.), inden forsøget indledes. Hvis disse oplysninger ikke foreligger, og det anses for nødvendigt, kan spikede kontrolvæv testes samtidig for at bestemme opbevaringsstabiliteten.

Analysemetodens kvalitet

65. Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af teststoffet i både vand-, sediment- og ormeprøver for den valgte metode. Det kontrolleres tillige, at testkemikaliet ikke kan påvises i

▼**M6**

kontrolkamrene i koncentrationer, som ligger over baggrundsniveauet. Om nødvendigt korrigeres C_w-, C_s- og C_a-værdierne for genfinding og baggrundsværdier i kontrollerne. Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at forurening og tab minimeres (f.eks. som følge af adsorption af teststoffet til prøvetagningsudstyret).

66. Den samlede genfinding og genfindingen af teststoffet i orme, sediment, vand og — hvis de anvendes — i udskillere med absorbenter, som kan tilbageholde fordampet teststof, registreres og rapporteres.

67. Eftersom det anbefales at avende radioaktivt mærkede stoffer, er det muligt at analysere for samlet radioaktivitet (dvs. oprindelige produkter og nedbrydningsprodukter). Hvis analysen kan gennemføres, kan en kvantitativ bestemmelse af det oprindelige stof og nedbrydningsprodukter ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen give vigtige oplysninger. Hvis det påtænkes at foretage disse målinger, underkastes prøverne passende ekstraktionsprocedurer, således at der kan foretages en kvantitativ bestemmelse af det oprindelige stof separat. Udgør et påvist nedbrydningsprodukt en signifikant procentdel (f.eks. > 10 %) af den radioaktivitet, der er målt i testorganismerne ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen, anbefales det at identificere de pågældende nedbrydningsprodukter (5).

68. På grund af lav individuel biomasse er det ofte ikke muligt at bestemme teststoffets koncentration i hver enkelt orm, medmindre der anvendes Branchiura sowerbyi (40-50 mg vådvægt pr. orm) som testart (11). Derfor er det acceptabelt at samle individer udtaget fra en given testbeholder, selvom det begrænser de statistiske procedurer, der kan anvendes på dataene. Hvis en bestemt statistisk metode og styrke er vigtige hensyn, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange testorganismer og/eller replikattestkamre til, at den ønskede pooling, procedure og styrke tilgodeses (6) (7).

69. Det anbefales, at BAF udtrykkes både som en funktion af den samlede vådvægt, samlede tørvægt og, når det er nødvendigt (f.eks. for stærkt lipofile stoffer), som en funktion af sedimentets fedtindhold og TOC. Fedtindholdet bestemmes ved hjælp af egnede metoder (48)(49). Som standardmetode kan ekstraktion (50) med chloroform/methanol anbefales (48). For at undgå brugen af chlorerede opløsningsmidler kan der anvendes en ringtestet tilpasning af Bligh og Dyer-metoden (50) som beskrevet i (51). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier (48), er det vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet. Når det er muligt, dvs. når tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, skal fedtindholdet måles på samme prøve eller ekstrakt som det, der blev udtaget til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved kromatografi (5). Det er dog praktisk i det mindste i starten eller — fortrinsvis — ved afslutningen af optagelsesfasen at bruge akklimatiserede kontroldyr til at måle fedtindholdet, f.eks. i tre prøver.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

70. Teststoffets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i teststoffet i/på ormene under optagelsesfasen mod tiden (lineære akser). Hvis kurven

▼M6

har nået et plateau, beregnes steady state BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ ved steady state eller på dag 28 (middel)}}{C_s \text{ ved steady state eller på dag 28 (middel)}}$$

71. Bestem den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAFK) som forholdet ks/ke. Elimineringskonstanten (ke) bestemmes normalt ud fra elimineringskurven (dvs. en afbildning af koncentrationen af teststoffet i ormene i løbet af elimineringsfasen). Hastighedskonstanten for optagelse, ks, beregnes herefter ud fra optagelseskurvens kinetik. Til at finde BAFK og hastighedskonstanterne, ks og ke, foretrækkes computerbaserede ikkelineære parameterestimeringsmetoder (tillæg 2). Hvis det er åbenlyst, at elimineringen ikke er af første orden, anvendes andre modeller (25)(27)(52).

72. Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF) bestemmes ved normalisering af BAFK for ormenes fedtindhold og sedimentets totale organiske kulstofindhold.

Fortolkning af resultater

73. Hvis der i testkoncentrationer måles koncentrationer nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed.

74. Skarpe optagelses- og elimineringskurver er tegn på bioakkumuleringsdata af høj kvalitet. Normalt bør konfidensgrænserne for BAF-værdier fra veltilrettelagte forsøg ikke overstige 25 % (5).

Testrapport

75. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger.

Teststof

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. log K_{ow}, vandopløselighed

— kemiske identifikationsdata, kilden til teststoffet, eventuelt anvendt opløsningsmiddels identitet og koncentration

— hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position, den specifikke radioaktivitet og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder.

Testarter

— videnskabeligt navn, stamme, herkomst, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse osv.

Testbetingelser:

— anvendt testprocedure (f.eks. statisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testdesign (f.eks. antal testkamre, materiale og størrelse, vandvolumen, sedimentmasse og -volumen, vandudskiftningsrate (for gennemstrømningsprocedurer eller semistatiske procedurer), eventuel beluftning før og under testen, antal replikater, antal orme pr. replikat, antal testkoncentrationer, optagelses- og elimineringsfasernes varighed, udtagningshyppighed)

▼M6

— metode til klargøring og applikation af testkemikalie samt begrundelse for valg af specifik metode

— nominelle testkoncentrationer

— kilde til bestanddelene i det kunstige vand og sediment eller — hvis der anvendes naturlige medier — vandets og sedimentets oprindelse, beskrivelse af eventuel forbehandling, resultater af eventuel påvisning af testorganismernes evne til at leve og/eller formere sig i de anvendte medier, sedimentets karakteristika (porevandets pH og ammoniak (naturlige sedimenter), organisk kulstofindhold (TOC), partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), procent vandindhold og eventuelt andre målinger) og vandets karakteristika (pH, hårdhed, ledningsevne, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt) og eventuelt andre målinger)

— den nominelle og målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) af det kunstige sediment, den målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) for marksedimenter

— vandkvaliteten i testkamrene karakteriseres med temperatur, pH, ammoniak, samlet hårdhed og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om, hvordan vand-, sediment- og ormeprøver er behandlet, herunder fremstilling, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststoffet og fedtindhold samt genfinding af teststoffet.

Resultater

— dødelighed for kontrolorme og ormene i hvert testkammer og eventuelt observerede subletale effekter, bl.a. unormal adfærd (f.eks. undgåelse af sediment, tilstedeværelse eller fravær af fækale pellets, manglende formering)

— den målte tørvægt i % af vådvægt (eller forholdet mellem tørvægt og vådvægt) for sedimentet og testorganismerne (nyttig til normalisering)

— ormenes fedtindhold

— kurver, der viser optagelses- og elimineringskinetikken for teststoffet i ormene samt tiden til steady state

— C_a, C_s og C_w (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) på alle prøvetagningstidspunkter (C_a udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af legemsvægt, C_s udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af sediment og C_w i mg l^{-1}). Hvis der kræves en biota-sedimentakkumuleringsfaktor (BSAF, se definition i tillæg 1) (f.eks. til sammenligning af resultaterne fra to eller flere test udført med dyr med forskelligt fedtindhold), kan C_a også udtrykkes som g kg^{-1} fedtindhold i organismen og C_s kan udtrykkes som g kg^{-1} organisk kulstof (OC) i sedimentet

— BAF (udtrykt i kg vådt sediment kg^{-1} våd orm), hastighedskonstant for optagelse fra sediment k_s (udtrykt i g vådt sediment kg^{-1} af våde orme d^{-1}) og hastighedskonstant for eliminering k_e (udtrykt i d^{-1}), BSAF (udtrykt i kg sediment OC kg^{-1} fedtindhold i orm) kan også registreres

▼**M6**

— ikkeeliminerede restkoncentrationer (NER) ved afslutningen af eliminationsfasen

— hvis det måles: procentdele af det oprindelige teststof, nedbrydningsprodukter og bundne restkoncentrationer (dvs. den procentdel af teststoffet, som ikke kan ekstraheres med almindelige ekstraktionsmetoder), der er påvist i testorganismerne

— metoder, som er anvendt til statistiske dataanalyser.

Vurdering af resultater

— resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i punkt 21

— uventede eller usædvanlige resultater, f.eks. ufuldstændig eliminering af teststoffet fra testorganismerne, i sådanne tilfælde kan resultater af et eventuelt foreløbigt forsøg give nyttige oplysninger.

▼M6

Tillæg 1

DEFINITIONER OG ENHEDER

Syntetisk sediment eller formuleret, rekonstitueret eller kunstigt sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Bioakkumulering: en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium. Bioakkumulering er resultatet af både biokoncentrerings- og biomagnifikationsprocesser (se nedenfor).

Bioakkumuleringsfaktoren (BAF) på ethvert tidspunkt i denne bioakkumuleringstests optagelsesfase: koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen (Ca i g kg^{-1} våd- eller tørvægt) divideret med koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium (Cs som g kg^{-1} våd- eller tørvægt sediment). For at betegne C_a- og C_s-enhederne har BAF enhederne kg sediment kg^{-1} orme (15).

Bioakkumuleringsfaktorer: beregnet direkte ud fra forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra sediment divideret med hastighedskonstanten for eliminering (henholdsvis k_s og ke, — se nedenfor) betegnes kinetiske bioakkumuleringsfaktorer (BAFK).

Biokoncentration: forøgelse af teststoffets koncentration i eller på en organisme udelukkende som følge af optagelse gennem kroppens overflade i forhold til teststoffets koncentration i det omgivende medium.

Biomagnifikation: en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme primært som følge af optagelsen af forurenet foder eller bytte i forhold til koncentrationen af teststoffet i foder eller bytte. Biomagnifikation kan medføre overførsel eller akkumulering af teststoffet i fødekæder.

Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF): den fedtindholdsnormaliserede steady state-koncentration af teststoffet i eller på testorganismen divideret med den organisk kulstofnormaliserede koncentration af teststoffet i sedimentet ved steady state. C_a udtrykkes da som g kg^{-1} fedtindhold i organismen, og C_s som g kg^{-1} organisk indhold i sedimentet.

Konditioneringsperiode: bruges til at stabilisere den mikrobielle bestanddel af sedimentet og fjerne f.eks. ammoniak fra sedimentets bestanddele; den finder sted, inden teststoffet tilsættes til sedimentet. Normalt kasseres det overliggende vand efter konditionering.

Eliminering af teststof: tabet af stoffet fra testorganismens væv ved aktive eller passive processer, der forekommer uafhængigt af tilstedeværelsen eller fraværet af teststoffet i det omgivende medium.

Elimineringsfase: tidsrummet efter overførsel af testorganismerne fra et forurenet medium til et medium uden teststoffet, hvor elimineringen (eller nettotabet) af stoffet fra testorganismerne undersøges.

Hastighedskonstanten for eliminering (k_e): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den reduktion af koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen, efter at testorganismerne er overført fra et medium med teststoffet til et medium uden dette stof; ke udtrykkes i d^{-1}.

▼M6

Ækvilibreringsperiode: skal give mulighed for fordeling af teststoffet mellem den faste fase, porevandet og det overliggende vand; den finder sted efter tilsætning af teststoffet til sedimentet og inden tilsætning af testorganismerne.

Octanol/vand-fordelingskoefficient (K_{ow}): forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt, også betegnet P_{ow}. Logaritmen K_{ow} (log K_{ow}) benyttes som rettesnor for et stofs potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

Organisk kulstof/vand-fordelingskoefficient (K_{oc}): forholdet mellem et stofs koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i sediment og stoffets koncentration i vand ved ligevægt.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Plateau eller steady state: ligevægten mellem de optagelses- og elimineringsprocesser, der forekommer samtidig i løbet af eksponeringsfasen. Man taler om steady state i afbildningen af BAF i hver prøvetagningsperiode i forhold til tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af BAF i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen statistisk signifikante forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder. For testkemikalier, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende (5).

Porevand eller interstitielt vand: det vand, der optager pladsen mellem sediment- eller jordpartikler.

Hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den forøgelse af koncentrationen af teststoffet i eller på testorganismen, der følger af fasen for optagelse fra sediment. k_s udtrykkes i g sediment kg^{-1} orme d^{-1}.

Spiket sediment eller forurenet sediment: sediment, som testkemikaliet er tilsat.

Steady state-bioakkumuleringsfaktor (BAF_{ss}): BAF ved steady state, som ikke ændres signifikant over en længere periode, idet koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium (C_s som g kg^{-1} våd- eller tørvægt sediment) er konstant i denne tidsperiode.

Optagelses- eller eksponeringsfase: det tidsrum, hvori testorganismerne eksponeres for testkemikaliet.

▼M6

Tillæg 2

Beregning af parametre for optagelse og eliminering

Den primære endepunkt i en bioakkumuleringstest er bioakkumuleringsfaktoren, BAF. Den målte BAF kan beregnes ved at dividere koncentrationen af teststoffet i testorganismen, C_a, med koncentrationen af teststoffet i sedimentet, C_s, ved steady state. Hvis steady state ikke nås i optagelsesfasen, beregnes BAF på samme måde for dag 28. Det skal angives, om BAF er baseret på steady state-koncentrationer.

De foretrukne midler til at finde den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_K), hastighedskonstanten for optagelse fra sediment (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e) er at benytte computerbaserede ikkelineære parameterestimeringsmetoder. På baggrund af tidsserierne for gennemsnitlige akkumuleringsfaktorer (C_a, middelværdier for hver prøvetagningsdato/C_s, middelværdier for hver prøvetagningsdato = AF) i optagelsesfasen baseret på vådvægt af orme og sediment og modelligningen

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ligning 1]}$$

hvor AF(t) er forholdet mellem koncentrationen af teststoffet i orme og dets koncentration i sedimentet på et givet tidspunkt (t) i optagelsesfasen, beregner disse computerprogrammer værdierne for BAF_K, k_s og k_e.

Når steady state nås i løbet af optagelsesfasen (dvs. $t = \infty$), kan ligning 1 reduceres til:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ligning 2]}$$

hvor

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [g sediment kg^{-1} orme d^{-1}]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d^{-1}]

I så fald er $k_s/k_e \times C_s$ en tilgang til koncentrationen af teststoffet i ormevæv ved steady state ($C_{a,ss}$).

Biota-sedimentakkumuleringsfaktoren (BSAF) beregnes på følgende måde:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

hvor foc er andelen af organisk kulstof i sediment, og flip er andelen af fedtstof i orm, begge baseret på enten tørvægt eller vådvægt.

På baggrund af en tidsserie af koncentrationsværdier kan elimineringskinetikken modelleres ved hjælp af følgende modelligninger og en computerbaseret ikkelineær parameterestimeringsmetode.

Middelværdien af den målte restkoncentration i kroppen ved afslutningen af optagelsesfasen anbefales som standardudgangspunkt. Værdien, der er modelleret/estimeret fra optagelsesfasen, benyttes kun, f.eks. hvis den målte værdi afviger signifikant fra den modellerede restkoncentration i kroppen. Se også punkt 50 om alternativ præeksponering af orme udvalgt til eliminering. Med denne tilgang menes prøver af disse præeksponerede orme på elimineringsfasens dag 0 at give en realistisk restkoncentration i kroppen, med hvilken elimineringskinetikken kan påbegyndes.

▼M6

Hvis de datapunkter, der er afsat i forhold til tid, indikerer et konstant eksponentielt fald i koncentrationen af teststoffet i testorganismerne, kan en etrumsmodel (ligning 4) bruges til at beskrive tidsforløbet for eliminering.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ligning 3]}$$

Elimineringsprocesser ser undertiden ud til at være tofasede og udvise et hurtigt fald i C_a i begyndelsen, som ændres til et langsommere tab af teststoffer i slutningen af elimineringsfasen (8)(19)(25)). De to faser kan fortolkes ud fra den antagelse, at der er to forskellige rum i den organisme, hvorfra teststof går tabt med forskellig hastighed. I sådanne tilfælde henvises til specifik litteratur (15) (16) (17) (25).

En torumseliminering beskrives f.eks. i følgende ligning (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ligning 4]}$$

A og B repræsenterer rummenes størrelse (i procent af den samlede restkoncentration i vævet), hvor A er rummet med hurtigt tab af stof, og B er rummet med langsomt tab af teststof. Summen af A og B giver 100 % af hele dyrets rumvolumen ved steady state. k_a og k_b repræsenterer de tilsvarende elimineringskonstanter [d^{-1}]. Hvis torumsmodellen tilpasses udskilningsdataene, kan hastighedskonstanten for optagelse k_s bestemmes som følger (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[ligning 5]}$$

Disse modelligninger bør dog bruges med forsigtighed, især når der opstår ændringer i teststoffets biotilgængelighed under testen (42).

Som alternativ til modelligningerne ovenfor kan kinetikken (k_s and k_e) også beregnes i et trin ved at anvende modellen for førsteordenskinetik på alle data fra både optagelses- og elimineringsfasen samtidig. En beskrivelse af en metode, der understøtter en sådan kombineret beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering, findes i (55) (56) og (57).

De ikkeeliminerede restkoncentrationer (NER) beregnes som et sekundært endepunkt ved at gange forholdet mellem den gennemsnitlige koncentration i ormene (C_a) på dag 10 i elimineringsfasen og den gennemsnitlige koncentration i ormene (C_a) ved steady state (dag 28 i optagelsesfasen) med 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ ved udløbet af eliminiering}(gns.) \times 100}{C_a \text{ ved steady state}(gns.)}}$$

▼M6

Tillæg 3

Eksempel på en prøvetagningsplan for en 28-dages bioakkumuleringstest

a) **Optagelsesfase (bl.a. en 4-dages ækvilibreringsfase)**

Dag	Aktiviteter
– 6	Fremstilling af tørvesuspension til sediment, konditionering af suspensionen i 48 timer
– 4	Spiking af sediment eller sedimentandel, blanding af alle bestanddele i sedimentet, fjernelse af sediment-prøver af behandlet sediment og kontrolsediment med opløsningsmiddel til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilsætning af overliggende vand, inkubation på testbetingelser (ækvilibreringsfase)
– 3/–2	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering
0	Måling af vandkvalitet (se punkt 52), fjernelse af replikater til udtagning af prøver af vand og sediment til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilfældig fordeling af orme til testkamrene, tilbageholdelse af et tilstrækkeligt antal delprøver af orme til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, kontrol af luft-forsyning, hvis der anvendes et lukket testsystem
1	Fjernelse af replikater til prøveudtagning, kontrol af luftforsyning, ormenes adfærd, vandkvalitet (se punkt 56), udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration
2	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes adfærd og temperatur.
3	Samme som dag 1.
4 - 6	Samme som dag 2.
7	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
8-13	Samme som dag 2.
14	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
15-20	Samme som dag 2.
21	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
22-27	Samme som dag 2.
28	Samme som dag 1, måling af vandkvalitet (se punkt 52), afslutning af optagelsesfase, tilbageholdelse af et tilstrækkeligt antal delprøver af orme til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt samt fedtindhold, overførsel af orme fra resterende eksponerede replikater til beholdere med rent sediment til elimineringsfasen (ingen tarmtømning), prøvetagning af vand, sediment og orme fra opløsningsmid-delkontroller, eventuelt prøvetagning af opsamlingsvæsker.
	Præeksponeringsaktiviteter (ækvilibreringsfase) bør planlægges under hensyntagen til teststoffets egen-skaber. Hvis det er nødvendigt, konditioneres det fremstillede sediment under overliggende vand ved 20 ± 2 °C i 7 dage. I så fald fremstilles sedimentet tidligere!
	Aktiviteter beskrevet for dag 2 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

▼**M6**

b) **Elimineringsfase**

Dag	Aktiviteter
– 6	Fremstilling af tørvesuspension til sediment, konditionering af suspensionen i 48 timer
– 4	Blanding af alle bestanddele i sedimentet, fjernelse af sedimentprøver af behandlet sediment og kontrolsediment med opløsningsmiddel til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilsætning af overliggende vand, inkubation på testbetingelser.
0 (dag 28 af optagel-sesfasen).	Måling af vandkvalitet (se punkt 52), overførsel af orme fra resterende eksponerede replikater til beholdere med rent sediment, efter **4-6 timer** fjernelse af replikater til udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration, tilfældig fordeling af orme til testkam-rene
1	Fjernelse af replikater til prøveudtagning, kontrol af luftforsyning, ormenes adfærd, vandkvalitet (se punkt 52), udtagning af vand-, sediment- og ormeprøver til bestemmelse af teststoffets koncentration
2	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes adfærd og temperatur.
3	Samme som dag 1.
4	Samme som dag 2.
5	Samme som dag 1.
6	Samme som dag 2.
7	Samme som dag 1, der kompenseres om nødvendigt for fordampet vand.
8-9	Samme som dag 2.
10	Samme som dag 1, afslutning af elimineringsfasen, måling af vandkvalitet (se punkt 52), prøve-tagning af vand, sediment og orme fra opløsningsmiddelkontroller, eventuelt prøvetagning af opsam-lingsvæsker.
	Fremstilling af sediment inden starten på elimineringsfasen på samme måde som inden optagelsesfasen.
	Aktiviteter beskrevet for dag 2 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

▼M6

Tillæg 4

Nogle fysisk-kemiske egenskaber for acceptabelt fortyndingsvand

BESTANDDEL	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 µg/l
Ikkeioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

SAMMENSÆTNING AF DET ANBEFALEDE REKONSTITUERERDE VAND

a) Calciumchloridopløsning

Opløs 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

b) Magnesiumsulfatopløsning

Opløs 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

c) Natriumhydrogencarbonatopløsning

Opløs 2,59 g $NaHCO_3$ i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

d) Kaliumchloridopløsning

Opløs 0,23 g KCl i deioniseret vand; fortynd til 1 l med deioniseret vand

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Det destillerede eller deioniserede vands ledningsevne må ikke overstige 10 μScm^{-1}.

25 ml af hver af opløsningerne a)-d) blandes, og der fortyndes til et samlet volumen på 1 l med deioniseret vand. Summen af calcium- og magnesiumioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l.

Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1, og forholdet mellem og Na- og K-ioner 10:1. Syrekapaciteten $K_{S4.3}$ i denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Fortyndingsvandet beluftes, indtil der er opnået iltmætning, og opbevares i ca. to dage uden yderligere beluftning inden brug.

pH af acceptabelt vand til fortynding bør ligge i området 6-9.

▼M6

Tillæg 5

Syntetisk sediment — anbefalinger til fremstilling og oplagring

I modsætning til kravene i testmetode C.8 (40) anbefales det, at tørveindholdet af det kunstige sediment er 2 % i stedet for 10 % af tørvægten, så det svarer til et lavt til moderat organisk indhold af naturlige sedimenter (58).

Procentdel tørre bestanddele i det kunstige sediment:

Bestanddel	Egenskaber	% tørt sediment
Tørv	Sphagnum — nedbrydningsgrad: »middel« — uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 0,5 mm) og lufttørret	2 ± 0,5
Kvartssand	Kornstørrelse: ≤ 2 mm, men 50 % af partiklerne skal være 50-200 μm	76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	22 ± 1
Fødekilde	*Folia urticae*, pulveriserede blade af *Urtica sp. (brændenælde), findelt (partikelstørrelse ≤ 0,5 mm) eller en blanding af pulveriserede blade af Urtica sp. med α-cellulose (1:* 1), i overensstemmelse med farmaceutiske standarder til konsum, ud over tørt sediment	0,4-0,5 %
Calciumcarbonat	$CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent, ud over tørt sediment	0,05-1
Deioniseret vand	Ledningsevne ≤ 10 μS/cm, ud over tørt sediment	30-50

Hvis der forventes høje ammoniakkoncentrationer, f.eks. hvis testkemikaliet har vist sig at hæmme nitrifikation, kan det være hensigtsmæssigt at erstatte 50 % af det kvælstofrige urtica-pulver med cellulose (f.eks. α-Cellulose-pulver, kemisk rent, partikelstørrelse ≤ 0,5 mm.).

Forberedelse

Tørven lufttørres og males til et fint pulver (kornstørrelse ≤ 0,5 mm, ingen synlige planterester). Der fremstilles en suspension af den krævede mængde tørvepulver ved hjælp af en portion deioniseret vand, som skal tilsættes til det tørre sediment (et vandvolumen på 11,5 × tørvægten af tørven har vist sig egnet til at producere en tørveslam (8), der kan røres) ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat.

pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH-værdien og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH-værdien måles igen og justeres om nødvendigt til 6,0 ± 0,5 med $CaCO_3$. Herefter blandes hele suspensionen med de øvrige tørre bestanddele under hensyntagen til en eventuel portion til spiking. Det resterende deioniserede vand tilsættes for at få et homogent sediment. pH-værdien måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5-7,5 med $CaCO_3$. Hvis der forventes udvikling af ammoniak, kan det dog være hensigtsmæssigt at holde sedimentets pH under 7,0 (f.eks. 6,0-6,5). Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Såfremt der forventes ammoniakudvikling, kan det kunstige sediment desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test (f.eks. sediment-vandforhold 1:4, højde på sedimentlag som i testbeholderne), inden tilsætning af testkemikaliet, dvs. at det overhældes med vand, som beluftes. Ved udløbet af konditioneringsperioden, fjernes og kasseres det overliggende vand. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det samlede organiske kulstofindhold (f.eks. tre prøver).

▼M6

Derefter blandes det forurenede kvartssand med sedimentet for hvert behandlingsniveau, sedimentet fordeles i replikattestbeholderne og overhældes med testvandet (f.eks. sediment-vandforhold 1:4, højde på sedimentlag som i testbeholderne). Derefter inkuberes beholderne under samme betingelser som i den efterfølgende test. Det er på dette tidspunkt, at ækvilibreringsperioden indledes. Det overliggende vand beluftes.

Den valgte fødekilde tilsættes før eller samtidig med tilsætningen af testkemikaliet til sedimentet. Det kan først blandes med tørvesuspensionen (se ovenfor). For omfattende nedbrydning af fødekilden inden tilsætningen af testorganismerne — f.eks. ved en lang ækvilibreringsperiode — kan dog undgås ved at sørge for, at tidsrummet mellem tilsætningen af foder og begyndelsen af eksponeringsperioden er så kort som muligt. For at sikre, at foderet er i tilstrækkelig kontakt med testkemikaliet, blandes fødekilden senest med sedimentet på den dag, hvor testkemikaliet tilsættes til sedimentet. Der kan gøres undtagelser, hvis ækvilibreringsperiodens længde fører til for stor mikrobiel nedbrydning af foderet, før testorganismerne tilsættes. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det samlede organiske kulstofindhold (f.eks. tre prøver af forurenet sediment eller kontrolsediment).

Tørvægten af bestanddelene (tørv, sand, kaolin) registreres i g og i procent af den samlede tørvægt.

Den mængde vand, der skal tilsættes til de tørre bestanddele under fremstillingen af sedimentet, registreres også i procent af samlet tørvægt (f.eks. betyder 100 % tørvægt + 46 % vand, at 1 000 g tørvægt får i alt 460 ml vand, hvilket giver 1 460 g vådt sediment).

Opbevaring

De tørre bestanddele i det kunstige sediment opbevares tørt og køligt ved stuetemperatur. Det klargjorte våde sediment kan opbevares (kun til senere brug i dyrkningen) ved 4 ± 2 °C i mørke i en periode på 2-4 uger fra fremstillingsdagen (8).

Sediment, der er tilsat teststoffet, anvendes straks, medmindre der foreligger oplysninger om, at det pågældende sediment kan opbevares, uden at det påvirker testkemikaliets toksicitet og biotilgængelighed. Prøver på spiket sediment kan opbevares under de betingelser, der anbefales for det pågældende teststof indtil analyse.

▼M6

Tillæg 6

Oligochaetarter, der anbefales til bioakkumuleringstestning

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

De tubificide oligochaeter (Tubificidae, Oligochaeta) Tubifex tubifex (Müller) lever i ferskvandssedimenter i rør, som er foret med slim. I disse rør ligger ormene med hovedet nedad og indtager sedimentpartikler og udnytter de dertil knyttede mikroorganismer og organiske affald. Bagenden ligger normalt og bølger i det overliggende vand af hensyn til vejrtrækningen. Selv om denne art lever i en lang række sedimenttyper over hele den nordlige halvkugle, foretrækker tubifex tubifex relativt fine kornstørrelser (59). Denne arts egnethed til økotoksikologiske test er f.eks. beskrevet i (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Dyrkningsmetoder

For at have et tilstrækkeligt antal tubifex tubifex til at foretage bioakkumuleringstest skal ormene holdes i en permanent laboratoriedyrkning. Et system bestående af syntetisk sediment baseret på den kunstige jord ifølge testmetode C.8 (40) og rekonstitueret vand ifølge testmetode C.1 anbefales til T. tubifex-dyrkning (8).

Beholdere af glas eller rustfrit stål med en højde på 12-20 cm kan bruges som dyrkningsbeholdere. Hver dyrkningsbeholder tilsættes et lag vådt syntetisk sediment fremstillet som beskrevet i tillæg 5. Dybden af sedimentlaget skal give mulighed for ormenes naturlige nedgravningsadfærd (minimumsdybde for T. tubifex: 2 cm). Rekonstitueret vand tilsættes til systemet. Forstyrrelse af sedimentet minimeres. Vandet beluftes forsigtigt (f.eks. to bobler pr. sekund med 0,45 μm-filtreret luft) ved hjælp af en pasteur-pipette, der er anbragt 2 cm over sedimentoverfladen. Den anbefalede dyrkningstemperatur er 20 ± 2 °C.

Ormene tilsættes dyrkningssystemet med en maksimal belastning på 20 000 individer/m^2 sedimentoverflade. En højere belastning kan forårsage en reduktion i vækst- og formeringshastigheder (43).

I kunstige sedimentkulturer skal ormene fodres. En diæt bestående af fintmalet fiskefoder, f.eks. TetraMin®, kan bruges som supplerende ernæring (8), Klerks 1994, personlig kommunikation. Fodermængderne skal sikre tilstrækkelig vækst og formering og holde opbygningen af ammoniak og svampevækst i kulturen på et minimum. Foder kan gives to gange om ugen (f.eks. 0,6-0,8 mg pr. cm^2 sedimentoverflade). Erfaringer fra praksis har vist, at tilsætning af foder, der er suspenderet og homogeniseret i deioniseret vand, kan lette en homogen foderfordeling på sedimentoverfladen i dyrkningsbeholderne.

For at forhindre akkumulering af ammoniak udskiftes det overliggende vand mindst en gang om ugen ved hjælp af et gennemstrømningssystem eller manuelt. Sedimentet udskiftes hver tredje måned i stamkulturerne.

Udtagning af prøver af orme fra kulturen kan ske ved at sigte dyrkningssedimentet gennem en 1 mm sigte, hvis der kun er brug for voksne. Til tilbageholdelse af kokoner er en maskestørrelse på 0,5 mm egnet, og afkom kræver en sigte på 0,25 mm. Sigterne kan anbringes i rekonstitueret vand, efter at sedimentet er sigtet. Ormene forlader nettet og kan samles op af vandet med en blød ståltang eller en pipette med flammepolerede kanter.

▼M6

Kun intakte og klart identificerede enheder af Tubifex tubifex (f.eks. (64)) bruges til at begynde en test eller nye kulturer. Syge eller skadede orme samt kokoner angrebet af svampehyfer skal kasseres.

En synkroniseret kultur kan med passende intervaller give orme i en bestemt alder, hvis det ønskes. Nye dyrkningsbeholdere opstilles med de valgte intervaller (f.eks. hver anden uge) og begynder med organismer af en vis alder (f.eks. kokoner). Under de her beskrevne dyrkningsbetingelser er ormene voksne efter 8-10 uger. Kulturerne kan høstes, når ormene har lagt nye kokoner, f.eks. 10 uger. De udtagne voksne kan bruges til test, og nye kulturer kan påbegyndes med kokonerne.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) forekommer også i ferskvandssedimenter over hele verden og anvendes i vid udstrækning i økotoksikologiske test. Oplysninger om arternes biologi, dyrkningsbetingelser og følsomhed kan indhentes fra (1)(6)(9)(36). Lumbriculus variegatus kan også dyrkes i det kunstige sediment, der anbefales for T. tubifex ifølge (8) inden for visse begrænsninger. Da L. variegatus i naturen foretrækker grovere sedimenter end T. tubifex (59), kan laboratoriekulturer med det kunstige sediment, som bruges til T. tubifex, ophøre efter 4-6 måneder. Erfaringer fra praksis har vist, at L. variegatus kan holdes i en sandet bund (f.eks. kvartssand, fint grus) i et gennemstrømningssystem med fiskefoder som næringskilde i flere år, uden at bunden udskiftes. En stor fordel ved L. variegatus i forhold til andre akvatiske oligochaetarter er dens hurtige reproduktion, som giver en hurtigt stigende biomasse i laboratoriedyrkede populationer (1)(6)(9)(10).

Dyrkningsmetoder

Dyrkningsbetingelser for Lumbriculus variegatus er detaljeret beskrevet i Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Nedenfor gives en kort sammenfatning af disse betingelser.

Ormene kan dyrkes i store akvarier (57-80 l) ved 23 °C med en lysperiode på 16 timers lys og otte timers mørke (100-1 000 lx) med dagligt udskiftet råvand (45-50 l pr. akvarium). Substratet klargøres ved at skære ublegede brune papirservietter i strimler, som derefter kan blandes med dyrkningsvand i nogle få sekunder, hvilket giver små stykker papirsubstrat. Dette substrat kan derefter bruges direkte i Lumbriculus-dyrkningsakvarierne ved at dække bunden af tanken eller opbevares frosset i deioniseret vand til senere brug. Nyt substrat i tanken vil generelt holde sig i ca. to måneder.

Hver ormekultur startes med 500-1 000 orme og tilføres en 10 ml suspension, som indeholder 6 g startfoder til ørred tre gange om ugen under udskiftnings- eller gennemstrømningsbetingelser. Statiske eller semistatiske kulturer bør modtage lavere fodermængder for at forhindre bakterie- og svampevækst. Foder- og papirsubstrat analyseres for stoffer, der skal bruges i bioakkumuleringstest.

Under disse betingelser fordobles antallet af individer i kulturen generelt på ca. 10-14 dage.

Lumbriculus variegatus kan fjernes fra kulturerne, f.eks. ved at overføre substrat med et finmasket net eller organismer med en flammepoleret glaspipette med bred åbning (ca. 5 mm i diameter) til et separat bæger. Hvis substrat føres med over i dette bæger, henstår bægeret, som indeholder orme og substrat, natten over under gennemstrømning, hvilket vil fjerne substratet fra bægeret, mens ormene

▼M6

bliver i bunden af beholderen. De kan derefter overføres til nye klargjorte dyrkningsbeholdere eller bearbejdes yderligere med henblik på testen, jf. (1) og (6). Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller dentale sonder i rustfrit stål til håndtering af ormene.

Et spørgsmål, der skal betragtes som afgørende, når der bruges L. variegatus i sedimentbioakkumuleringstest, er ormens forplantningsform (fragmentation efterfulgt af regenerering). Denne vegetative formering resulterer i to fragmenter, som ikke indtager føde i en vis periode, indtil hoved- eller haledelen er regenereret (f.eks. (36)(37)). Dette betyder, at optagelse af sediment og forurenende stof gennem indtagelse måske ikke finder sted kontinuerligt hos L. variegatus som hos tubificider, der ikke formerer sig ved fragmentation.

Derfor bør der gennemføres en synkronisering for at minimere ukontrolleret reproduktion og regenerering og efterfølgende høj variation i testresultaterne. En sådan variation kan forekomme, når individer, der har fragmenteret sig og derfor ikke indtager føde i en periode, er mindre eksponeret for teststoffet end andre individer, der ikke fragmenterer sig under testen, f.eks. (38). 10-14 dage inden påbegyndelsen af eksponeringen fragmenteres ormene kunstigt (synkronisering) (65). Der bør anvendes store orm, som helst ikke må vise tegn på nylig fragmentering. Disse orme kan anbringes på en glasplade i en dråbe dyrkningsvand og dissekeres i det mediane kropsområde med en skalpel. Bagenderne skal have samme størrelse. Bagenderne henstår herefter i en dyrkningsbeholder, der indeholder samme substrat som kulturen og rekonstitueret vand, så de kan regenerere nye hoveder indtil eksponeringsperiodens start. Det er et tegn på, at nye hoveder er regenereret, når de synkroniserede orme graver sig ned i substratet (tilstedeværelse af nye hoveder kan bekræftes ved at undersøge en repræsentativ delprøve under binokulært mikroskop). Testorganismerne forventes derefter at være i tilsvarende fysiologisk tilstand. Det betyder, at når regenerering forekommer hos synkroniserede orme under testen, forventes stort set alle dyr at være eksponeret for det forurenede sediment i samme grad. Fodring af de synkroniserede orme sker, så snart ormene begynder at grave sig ned i substratet eller syv dage efter dissektion. Fodersystemet skal være sammenligneligt med fodersystemet for de almindelige kulturer, men det kan være hensigtsmæssigt at fodre de synkroniserede orme med samme fødekilde som i testen. Ormene holdes ved testtemperatur, 20 °C ± 2 °C. Efter regenerering anvendes de intakte hele orme af samme størrelse, som aktivt svømmer eller kryber efter en let, mekanisk påvirkning, til testen. Skader eller autotomi hos ormene bør forhindres, f.eks. ved at bruge pipetter med flammepolerede kanter eller dentale sonder i rustfrit stål til håndtering af ormene.

Når Lumbriculus variegatus bruges i testen, bør der på grund af denne arts særlige reproduktionsform forekomme en stigning i antallet af orme i løbet af testen, hvis betingelserne er passende (6). Manglende reproduktion i en bioakkumuleringstest med L. variegatus registreres og tages i betragtning ved fortolkning af testresultaterne.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (ikke valideret i ringtest)**

Branchiura sowerbyi lever i forskellige sedimenttyper i reservoirer, søer, damme og floder, oprindelig i tropiske områder. De kan også ses i varme vandområder på den nordlige halvkugle. De forekommer dog hyppigere i mudder-lersedimenter med et højt indhold af organisk materiale. Endvidere lever ormene i sedimentlaget. Selv bagenden af ormene er normalt nedgravet. Denne art kan

▼M6

let identificeres ud fra gælletrådene på bagenden. De voksne kan nå en længde på 9-11 cm og en vådvægt på 40-50 mg. Ormene har en høj reproduktionshastighed og kan fordoble populationen på under to uger og under de nedenfor beskrevne temperatur- og fodringsbetingelser (Aston et al., 1982, (65)). B. sowerbyi er blevet brugt i både toksicitets- og bioakkumuleringsforsøg (henholdsvis Marchese & Brinkhurst 1996, (31) og Roghair et al. 1996, (67)).

Dyrkningsmetoder

Et resumé af dyrkningsbetingelserne for Branchiura sowerbyi er anført nedenfor (fra Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina og Carla J. Roghair, RIVM, Nederlandene).

Der kræves ikke en enkelt teknik til dyrkning af testorganismerne. Organismerne kan dyrkes i uforurenet naturligt sediment (31). Erfaring fra praksis har vist, at et medium bestående af naturligt sediment og sand forbedrer ormenes tilstand sammenlignet med rent naturligt sediment (32)(67). 3 l-bægerglas, der indeholder 1 500 ml sediment/vand-medium bestående af 375 ml naturligt uforurenet sediment (ca. 10 % totalt organisk kulstof, ca. 17 % af partiklerne ≤ 63 μm), 375 ml rent sand (M32) og 750 ml rekonstitueret eller afkloret ledningsvand, kan bruges til dyrkningen (31)(32)(67). Papirservietter kan også bruges som substrat til dyrkningen, men populationens vækst er lavere end i naturligt sediment. I semistatiske systemer beluftes vandlaget i bægerglasset langsomt, og det overliggende vand udskiftes en gang om ugen.

Hvert bægerglas indeholder 25 unge orme til at begynde med. Efter to måneder udtages de store orme af sedimentet med en pincet og anbringes i et nyt bægerglas med frisklavet sediment/vandmedium. Det gamle bægerglas indeholder også kokoner og afkom. Der kan høstes op til 400 unge orme pr. bægerglas på denne måde. Voksne orme kan bruges til reproduktion i mindst et år.

Kulturerne skal være reguleret til en temperatur i området 21-25 °C. Temperaturvariationen holdes under ± 2 °C. Den tid, der går til fosterudvikling, fra et æg bliver lagt, til afkommet forlader kokonen, er ca. tre uger ved 25 °C. Ægproduktionen pr. overlevende orm hos B. sowerbyi viste sig at ligge fra 6,36 (31) til 11,2 (30) i mudder ved 25 °C. Antallet af æg pr. kokon fra 1,8 til 2,8 (66)(69) eller op til 8 (68).

Opløst ilt, vandets hårdhed, temperatur og pH-værdi måles en gang om ugen. Fiskefoder (f.eks. TetraMin®) kan tilsættes som suspension to eller tre gange om ugen ad libitum. Ormene kan også fodres med optøet salat ad libitum.

En stor fordel ved denne art er den høje individuelle biomasse (op til 40-50 mg vådvægt pr. individ). Derfor kan denne art bruges til at teste bioakkumulering af ikke radioaktivt mærkede teststoffer. Den kan eksponeres i systemer, der bruges til T. tubifex eller L. variegatus med et enkelt individ pr. replikat (11). Replikationen bør dog i så fald øges, medmindre der anvendes større testkamre (11). Validitetskriteriet i forbindelse med nedgravningsadfærd skal tilpasses denne art.

▼**M6**

LITTERATUR

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. I ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Europa-Kommissionen (EK) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Kontoret for De Europæiske Fællesskabers Officielle Publikationer, Luxembourg.

(3) OECD (1992a), Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment, OECD Monographs No. 60, Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD), Paris.

(4) C. G. Ingersoll, G. T. Ankley, D. A. Benoit, E. L. Brunson, G. A. Burton, F. J. Dwyer, R. A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King og P. V. Winger (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications, Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, marts 2000.

(7) Kapitel C.27 i dette bilag, Toksicitetstest sediment/vand på chironomider med forurenet sediment.

(8) Ph. Egeler, J. Römbke, M. Meller, Th. Knacker, C. Franke, G. Studinger og R. Nagel (1997), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions, Chemosphere, 35, 835-852.

(9) C. G. Ingersoll, E. L. Brunson, N. Wang, F. J. Dwyer, G. T. Ankley, D. R. Mount, J. Huckins og J. Petty og P. F. Landrum (2003), Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) G. L. Phipps, G. T. Ankley, D. A. Benoit og V. R. Mattson (1993), Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Ph. Egeler, J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke og G. Studinger (1999), Workshop on »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) J.R. Kelly, S.N. Levine, L.A. Buttel, A.C. Kelly, D.T. Rudnick og R.D. Morton (1990), Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) M. Nendza (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel og R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) P.F. Landrum, H. Lee II og M.J. Lydy. (1992), Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) R.D. Markwell, D.W. Connell og A.J. Gabric (1989), Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) A.J. Gabric, D.W. Connell og P.R.F. Bell (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) J. Kukkonen og P. F. Landrum (1994), Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) C. Franke, G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg og U. Jöhncke (1994), The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) 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.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Følgende kapitler i dette bilag:

Kapitel A.4, Damptryk

Kapitel A.5, Overfladespænding

Kapitel A.6, Vandopløselighed

Kapitel A.8, Fordelingskoefficient, rystekolbemetode

Kapitel A.24, Fordelingskoefficient, HPLC-metode

Kapitel C.7, Nedbrydning — abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH

Kapitel C.4 A-F Bestemmelse af »let« bionedbrydelighed

Kapitel C.19, Bestemmelse af adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord og i kloakslam med HPLC (high performance liquid chromatography)

Kapitel C.29, Let bionedbrydelighed — CO_2 i lukkede beholdere

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) M.D. Antoine, S. Dewanathan og G. Patonay (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

(25) B. Beek, S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke og G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In O. Hutzinger, (red.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) A. Spacie og J.L. Hamelink (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) D.W. Hawker og D.W. Connell (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) E. L. Brunson, T. J. Canfield, C. J. Ingersoll og N. E. Kemble (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) T.B. Reynoldson, S.P. Thompson og J.L. Bamsey (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) R.J. Aston og A.G.P. Milner (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) M.R. Marchese og R.O. Brinkhurst (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) C.J. Roghair og A. Buijze (1994), Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Kapitel C.1 i dette bilag, Akut toksicitet for fisk.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Toksicitetstest for fisk i de tidlige udviklingsstadier OECD, Paris.

(35) J. L. Kaster, J. V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski og M. E. Smith (1984), Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) M. T. Leppänen og J. V. K. Kukkonen 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing, Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) M.T. Leppänen og J.V.K. Kukkonen (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller), Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) M. Martinez-Madrid, P. Rodriguez, J. I. Perez-Iglesias og E. Navarro (1999), Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay, Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) P. F. Landrum (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi, Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) T.L. Poddubnaya (1980), Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst og D.G. Cook (red.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) R.N. Hooftman, K. van de Guchte og C.J. Roghair (1993), Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) C. Franke (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) D. R. Mount, T. D. Dawson og L. P. Burkhard (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus, Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) R.C. Randall, H. Lee II, R.J. Ozretich, J.L. Lake og R.J. Pruell (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) W.S. Gardner, W.A. Frez, E.A. Cichocki og C.C. Parrish (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) E.G. Bligh og W.J. Dyer (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) J. De Boer, F. Smedes, D. Wells og A. Allan (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) P. Kristensen (1991). (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Vandkvalitetsinstituttet, Danmark.

(53) S. Zok, G. Görge, W. Kalsch og R. Nagel (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) R. Nagel (1988). (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Tyskland.

(55) M.P.M. Janssen, A. Bruins, T.H. De Vries og N.M. Van Straalen (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) T.C. Van Brummelen og N.M. Van Straalen (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) I. Sterenborg, N.A. Vork, S.K. Verkade, C.A.M. Van Gestel og N.M. Van Straalen (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) B. C. Suedel og J. H. Rodgers (1993), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) B. Wachs (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) B.G. Oliver (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) P.M. Chapman, M.A. Farrell og R.O. Brinkhurst (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) P.M. Chapman, M.A. Farrell og R.O. Brinkhurst (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) P. Rodriguez og T. B. Reynoldson (1999), Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment, In: A. Mudroch, J.M. Azcue og P. Mudroch (red.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality, Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) R. O. Brinkhurst (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta, Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Ph. Egeler, M. Meller, H. J. Schallnaß og D. Gilberg (2005), Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) R.J. Aston, K. Sadler og A.G.P. Milner (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) C.J. Roghair, A. Buijze, M.P.A. Huys, M.A.H. Wolters-Balk, E.S.E. Yedema og J.L.M. Hermens (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) R.J. Aston (1984), The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) C. Bonacina, A. Pasteris, G. Bonomi og D. Marzuoli (1994), Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. TOKSICITETSTEST MED FISK I DE TIDLIGE UDVIKLINGSSTADIER

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 210 (2013). Test med fisk i de tidlige udviklingsstadier har til formål at bestemme kemikaliers letale og subletale virkninger på de testede stadier og arter. De giver nyttige oplysninger til estimering af kemikaliets kroniske letale og subletale virkninger på andre fiskearter.

2. Testvejledning 210 er baseret på et forslag fra Det Forenede Kongerige, som blev drøftet på et møde med deltagelse af OECD-eksperter i Medmenham (Det Forenede Kongerige) i november 1988, og blev opdateret i 2013 for at afspejle erfaringerne med brug af testen og anbefalinger fra en OECD-workshop om toksicitetstest med fisk, som blev afholdt i september 2010 (1).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Fisk i de tidlige udviklingsstadier udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand. Gennemstrømningsbetingelser foretrækkes, men hvis det ikke kan lade sig gøre, er semistatiske betingelser acceptable. Nærmere oplysninger findes i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2). Testen indledes ved at anbringe befrugtede æg i testkamre og fortsættes i det artsspecifikke tidsrum, der er nødvendigt for, at kontrolfiskene når yngelstadiet. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) med henblik på at bestemme i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) ECx (f.eks. EC10, EC20) ved hjælp af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en ændring i den målte virkning på x %. Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovgivningsmæssige rammer. ECx skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, således at ECx opnås ved interpolering og ikke ved ekstrapolering (definitioner er anført i tillæg 1).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Ved testkemikaliet forstås det kemikalie, der testes. Testkemikaliets vandopløselighed (se kapitel A.6 i dette bilag) og damptryk (se kapitel A.4 i dette bilag) bør være kendt, og der bør foreligge en pålidelig analysemetode til kvantificering af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse. Selv om det ikke er nødvendigt for at gennemføre testen, kan resultater fra en akut toksicitetstest (se kapitel C.1 eller C.49 i dette bilag), fortrinsvis udført på den art, der er valgt til denne test, give nyttige oplysninger.

5. Hvis forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding, skal der så vidt muligt foreligge oplysninger om dens sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og deres stofspecifikke egenskaber (som de ovenfor nævnte). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.

6. Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, stoffets renhed, vandopløselighed, vand- og lysstabilitet, pK_a, P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (f.eks. kapitel C.4 eller C.29 i dette bilag).

▼M7

TESTENS GYLDIGHED

7. Følgende betingelser skal være til stede, for at testen betragtes som gyldig:

— koncentrationen af opløst oxygen skal være > 60 % af værdien for mætning med luft i hele testperioden

— vandtemperaturen må ikke variere mere end ± 1,5 °C imellem testkamrene eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen, og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art (tillæg 2)

— der skal foretages en analytisk måling af testkoncentrationerne

— den generelle overlevelse af befrugtede æg og succesen efter klækning i kontrollerne og, hvor relevant, i opløsningsmiddelkontrollerne skal være større end eller lig med de i tillæg 2 fastsatte grænseværdier.

8. Hvis der konstateres en mindre afvigelse fra validitetskriterierne, bør konsekvenserne holdes op imod testdataenes pålidelighed, og disse overvejelser bør fremgå af rapporten. Virkningerne på overlevelse, klækning eller vækst i opløsningsmiddelkontrollen, sammenlignet med den negative kontrol, bør rapporteres og drøftes i forbindelse med testdataenes pålidelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testkamre

9. Enhver type glas, rustfrit stål eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Eftersom silikone er kendt for en høj evne til absorbering af lipofile stoffer, bør brug af silikonerør i gennemstrømningsforsøg og brug af silikonelåg ved kontakt med vand minimeres, f.eks. ved brug af monoblokglasakvarier. Forsøgsbeholderne bør være store nok til at tillade tilstrækkelig vækst i kontrollen, opretholde koncentrationen af opløst oxygen (f.eks. vil et tankvolumen på 7 l være tilstrækkelig til små fiskearter) og opfylde de kriterier for belastningsgrad, der er anført i punkt 19. Testkamrene bør anbringes randomiseret i testområdet. Et randomiseret blok-design, hvor samme behandling forefindes i hver blok, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret design. Testkamrene bør skånes for unødvendige forstyrrelser. Testsystemet bør konditioneres med koncentrationer af testkemikaliet i et tilstrækkeligt tidsrum til at udvise stabile eksponeringskoncentrationer forud for tilsætningen af testorganismer.

Valg af fiskeart

10. Anbefalede fiskearter fremgår af tabel 1. Der kan anvendes andre arter, men forsøgsmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Der skal da anføres en begrundelse for valg af art og forsøgsmetode.

Opbevaring af fisk til yngel

11. Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende forhold kan findes i tillæg 3 og i de angivne kilder i henvisning (3)(4)(5).

Håndtering af befrugtede æg, embryoner og larver

12. Befrugtede æg, embryoner og larver kan i første omgang eksponeres i hovedbeholderen i mindre beholdere af glas eller rustfrit stål, som er forsynet med netsider eller -ender, således at testopløsningen kan strømme gennem beholderen. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre

▼M7

beholdere ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger beholderne op og ned, dog altid med organismerne under overfladen. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning.

13. I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i testbeholderen, skal disse fjernes, når æggene klækkes, jf. vejledningen i tillæg 3, idet man dog beholder det netværk, som hindrer larverne i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne larver fra beholdere. Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og bør dokumenteres i rapporten. En overførsel er dog ikke altid nødvendig.

Vand

14. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst (se tillæg 4). Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne kompleks med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), ammoniak, samlet residual mængde chlorpesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Såfremt man ved, at vandet har variabel kvalitet, skal målingerne foretages oftere; hyppigheden afhænger af, hvor variabel kvaliteten er. I tillæg 4 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

15. Til gennemstrømningstestene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med testkemikaliet (f.eks. peristaltpumper, proportional diluter, saturator system) for at yde en række forskellige koncentrationer til testkamrene. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumenet af mindst fem testkamre pr. døgn er fundet passende (3). Hvis belastningsgraden i punkt 19 overholdes, er en lavere flow-hastighed svarende til volumenet af f.eks. 2-3 testkamre imidlertid mulig for at forhindre hurtig fjernelse af foder.

16. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydbehandling). Saturation colums (solubility columns) eller passiv dosering (6) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærestof. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, bør der imidlertid anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne, dvs. at opløsningsmiddelniveauerne fortrinsvis skal være de samme i alle koncentrationer og i opløsningsmiddelkontrollen. I visse fortyndersystemer kan det være teknisk vanskeligt; her bør opløsningsmiddelkoncentrationen i opløsningsmiddelkontrollen være den samme som for den højeste opløsningsmiddelkoncentration i behandlingsgruppen. Nærmere oplysninger om stoffer, der er vanskelige at teste, findes i OECD Guidance Document No. 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2). Hvis der bruges opløsningsmiddel, afgøres valget af opløsningsmiddel af stoffets kemiske egenskaber. OECD's vejledning nr. 23 anbefaler en maksimal koncentration på 100 µl/l. For at forhindre, at opløsningsmidlet potentielt får indflydelse på

▼M7

de målte endepunkter (7), anbefales det at holde opløsningsmiddelkoncentrationen så lav som muligt.

17. I den semistatiske test kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen. Enten fremstilles nye testopløsninger i rene beholdere, og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt til de nye beholdere, eller også bibeholdes testorganismerne i testbeholderne, mens en andel (mindst to tredjedele) af testopløsningen/kontrolvolumenet udskiftes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Varighed

18. Testen bør påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtningen, og det foretrækkes, at æggene nedsænkes i testopløsningerne, inden blastocysten begynder at dele sig eller så hurtigt som muligt efter denne fase. Testens varighed afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i tillæg 2.

Belastning

19. Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene bør fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger, og der bør anvendes mindst 80 æg, ligeligt fordelt, til mindst fire replikate testkamre pr. koncentration. Belastningsgraden (biomasse pr. volumen af testopløsningen) bør være så lav, at den opløste iltkoncentration på mindst 60 % af luftmætningsværdien kan vedligeholdes uden beluftning i ægge- og larvefasen. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsgrad på ikke over 0,5 g/l pr. døgn og ikke over 5 g/l (våd vægt) opløsning på noget tidspunkt (3).

Lys og temperatur

20. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i forsøget (se tillæg 2).

Fodring

21. Foder og fodring er af afgørende betydning, og det er vigtigt, at fiskene fodres med det rette foder til den enkelte livsfase fra et passende tidspunkt og på et niveau, der er tilstrækkeligt til at sikre normal vækst. Fodringen skal være nogenlunde ens på tværs af replikater, medmindre den justeres for at tage hensyn til dødelighed. Overskydende foder og ekskrementer bør fjernes i nødvendigt omfang for at undgå ophobning af affald. Detaljerede fodersystemer er anført i tillæg 3, men efterhånden som der høstes erfaring, forbedres foder- og fodringssystemerne løbende for at øge overlevelsen og optimere væksten. Levende foder beriger miljøet og bør derfor anvendes i stedet for eller som supplement til tør- eller frostfoder, når det er hensigtsmæssigt i forhold til arten og livsfasen.

Testkoncentrationer

22. Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikaliet, med mindst fire replikater pr. koncentration, med en konstant afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Hvis der foreligger oplysninger om den akutte test, fortrinsvis med samme art og/eller en forprøve, bør der tages højde herfor (1), når man vælger området for testkoncentrationerne. Alle informationskilder bør dog tages i betragtning, når man vælger området for testkoncentrationerne, herunder kilder som analogislutning og testdata om akut toksicitet for fiskeembryoner. En grænsetest, eller en udvidet grænsetest, med færre end fem koncentrationer i den endelige test kan accepteres, hvis der kun skal fastlægges empiriske NOEC-værdier. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end fem koncentrationer. Det er ikke nødvendigt at teste

▼M7

koncentrationer højere end svarende til 96 timer LC_{50} eller 10 mg/l, afhængigt af hvilken af disse der er lavest.

Kontroller

23. En fortyndingsvandkontrol og, om nødvendigt, en opløsningsmiddelkontrol, som indeholder opløsningsmidlet som bærestof, bør foretages ud over koncentrationsserien med testkemikaliet (se punkt 16).

Hyppighed af analyser og målinger

24. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikalietilførselssystemet til alle replikater fungerer korrekt (f.eks. ved måling af testkoncentrationer). De nødvendige analysemetoder bør være fastlagt, herunder en passende bestemmelsesgrænse (LOQ) og tilstrækkeligt kendskab til stoffets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum for at bestemme eksponeringen. Der skal foretages mindst fem bestemmelser. I gennemstrømningssystemer bør der foretages analytiske målinger af testkemikaliet i en replikat pr. koncentration mindst en gang om ugen, idet der systematisk skiftes mellem replikaterne. Yderligere analytiske bestemmelser vil ofte forbedre kvaliteten af testresultaterne. Det kan være nødvendigt at filtrere prøverne for at fjerne eventuelle partikler (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm) eller centrifugere dem for at sikre, at bestemmelserne foretages på kemikaliet i ægte opløsning. For at reducere adsorptionen af testkemikaliet bør filtrene være mættet før brug. Når de målte koncentrationer ikke ligger inden for 80-120 % af den nominelle koncentration, bør effektkoncentrationerne bestemmes og udtrykkes i forhold til den aritmetiske gennemsnitskoncentration for gennemstrømningstest (oplysninger om beregning af det aritmetiske gennemsnit findes i tillæg 6 til forsøgsmetode C.20 (8)) og udtrykkes i forhold til det geometriske gennemsnit af de målte koncentrationer ved semistatiske test (se kapitel 5 i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2)).

25. Under forsøget bør opløst ilt, pH og temperatur måles i alle testbeholdere, mindst en gang om ugen, og saltholdigheden og hårdheden om fornødent ved forsøgets start og slutning. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

26. **Embryonets udviklingstrin**: Det embryonale stadie bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelse, hvor embryonet udsættes for testkemikaliet. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og renses.

27. **Udklækning og overlevelse**: Observationer om udklækning og overlevelse foretages mindst en gang om dagen og noteres. Hvis der observeres svamp på æg på et tidligt trin i embryonets udvikling (f.eks. på forsøgets dag et eller to), bør de pågældende æg tælles og fjernes. Døde embryoner, larver og fiskeyngel bør fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt og ødelægges af de andre fisk. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke fysisk beskadiges. Tegn på død varierer afhængigt af art og udviklingsstadie. For eksempel:

▼M7

— for befrugtede æg: særligt i de tidlige stadier et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed

— for embryoner, larver og fiskeyngel: manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller manglende respons på mekaniske stimuli.

28. **Abnormt udseende**: Antallet af larver eller fiskeyngel, der udviser abnorm kropsform, skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme larver og fiskeyngel optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Når misdannelser og dertil knyttet abnorm adfærd betragtes som så alvorlige, at organismen lider betragteligt herunder, og har nået et niveau, hvor den ikke vil vende tilbage til en normal tilstand, kan organismen fjernes fra forsøget. Sådanne dyr skal aflives og indgår i dødeligheden i forbindelse med den efterfølgende dataanalyse. Normal embryonal udvikling er dokumenteret for de fleste fiskearter, der anbefales i denne forsøgsmetode (9) (10) (11) (12).

29. **Abnorm opførsel**: Abnorm opførsel, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning, atypisk ubevægelighed og atypisk adfærd ved fodring, skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed (f.eks. en gang om dagen for arter, der lever i varmt vand). Disse virkninger kan, når de opdages, selv om de er vanskelige at kvantificere, hjælpe med til at tolke mortalitetsdata.

30. **Vægt**: Ved forsøgets afslutning skal samtlige overlevende fisk som minimum vejes for replikater (registrering af antal dyr i replikatet og gennemsnitsvægten pr. dyr): Vådvægt (duppet tør) er at foretrække, men oplysninger om tørvægt kan også registreres (13).

31. **Længde**: Ved forsøgets afslutning måles individernes længde. Totallængden foretrækkes, men hvis der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, kan standardlængden anvendes. Samme metode bør anvendes til alle fisk i en given test. Den individuelle længde kan måles ved enten f.eks. skydelærer, digitalt kamera eller kalibreret okularmikrometer. Typiske minimumslængder er defineret i tillæg 2.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

32. Det anbefales, at testdesignet og valget af statistisk test muliggør tilstrækkelig power (mindst 80 %) til at opdage ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC-værdi. Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovgivningsmæssige rammer. Hvis der skal registreres en EC_x-værdi, bør testdesignet og valget af regressionsmodel gøre det muligt at beregne EC_x således at i) det registrerede 95 %-konfidensinterval for EC_x ikke omfatter nul og ikke er for bredt, ii) 95 %-konfidensintervallet for det forventede gennemsnit ved EC_x ikke omfatter kontrolgennemsnittet, og iii) der ikke er tale om betydelig manglende overensstemmelse mellem regressionsmodellen og dataene. Begge metoder kræver identifikation af den procentvise ændring for hvert af de endepunkter, som det er vigtigt at undersøge eller beregne. Testdesignet skal tilpasses til dette formål. Når ovennævnte betingelser for fastsættelsen af EC_x ikke er opfyldt, bør NOEC-metoden anvendes. Det er ikke sandsynligt, at den samme procentvise ændring gælder for alle endepunkter, og det er heller ikke sandsynligt, at der kan designes et forsøg, som opfylder disse kriterier for alle endepunkter, og man bør derfor i forbindelse med

▼M7

testdesignet fokusere på de endepunkter, der er vigtige for de respektive forsøg. Statistiske flowdiagrammer og retningslinjer for de enkelte metoder findes i tillæg 5 og 6 som hjælp til databehandlingen og valget af den mest egnede statistiske test eller model. Andre statistiske metoder kan anvendes, forudsat at de er videnskabeligt begrundede.

33. Det er, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse eller kontingenstabeller, og der bør anvendes passende statistiske metoder på grundlag af denne analyse. For at foretage en multisammenligning mellem resultaterne fra de enkelte koncentrationer og kontrollerne anbefales step-down Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test til kontinuerlige responser og step-down Cochran-Armitage-testen til enten/eller-responser, der stemmer overens med et monotont koncentration/respons-forhold uden tegn på ekstra-binomial varians (14). Hvis der er tegn på ekstra-binomial varians, anbefales Rao-Scotts modificerede version af Cochran-Armitage-testen (15) (16) eller Williams' eller Dunnetts test (efter en arcsin-kvadratrodstransformation) eller Jonckheere-Terpstra-testen anvendt på replikatandele. Hvis dataene ikke stemmer overens med et monotont koncentration/respons-forhold, kan Dunnetts eller Dunns test eller Mann-Whitney-testen være nyttig til kontinuerlige responser og Fishers eksakte test til enten/eller-responser (14) (17) (18). I forbindelse med anvendelsen af enhver statistisk metode eller model bør det sikres, at metodens eller modellens betingelser er opfyldt (f.eks. at variabiliteten mellem kamrene er beregnet, og at der tages højde herfor i forsøgsdesignet og i den anvendte test eller model). Dataene skal evalueres med hensyn til normalitet, og tillæg 5 indeholder oplysninger om, hvad der skal ske med residualerne fra en variansanalyse. Tillæg 6 indeholder supplerende betragtninger om regressionsmodellen. Det bør overvejes at anvende transformationer for at opfylde betingelserne for en statistisk test. Der skal dog udvises forsigtighed med at anvende transformationer med henblik på fitning af en regressionsmodel, eftersom en ændring på 25 % i den utransformerede respons ikke svarer til en ændring på 25 % i en transformeret respons. I alle analyser er testkammeret, ikke de enkelte fisk, analyseenheden og forsøgsenheden, hvilket bør komme til udtryk i både hypotesetesten og regressionsanalysen (3) (14) (19) (20).

Testrapport

34. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

Stof med kun en bestanddel

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testart:

— videnskabeligt navn, stamme, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

▼M7

Testbetingelser:

— den anvendte forsøgsmetode (f.eks. semistatisk eller gennemstrømning, belastning)

— lysperiode(r)

— testdesign (fx antal testkamre og replikater, antal æg pr. replikat, testkammerets materiale og størrelse (højde, bredde, volumen), vandvolumen pr. testkammer)

— fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)

— metode til dosering af testkemikaliet (f.eks. pumper, fortyndingssystemer)

— metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— karakteristik af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt

— vandkvalitet i testbeholderne, pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultaterne anført individuelt (eller pr. replikat) og som gennemsnit og variationskoefficient, hvis det er relevant, for følgende endepunkter:

— bevis på, at testdyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard (tillæg 2)

— data vedrørende mortalitet på hvert stadie (embryon, larve og fiskeyngel) og kumulativ mortalitet

— antal dage til klækningen, det daglige antal larver, der klækkes, og sluttidspunkt for klækning

— antal sunde fisk ved afslutning af testen

— data vedrørende længde (angiv enten standardlængde eller totallængde) og vægt af overlevende dyr

— morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer, og antal angives

— adfærdspåvirkninger beskrives, hvis de forekommer, og antal angives

— statistisk analysemetode (regressionsanalyse eller variansanalyse) og behandling af data (anvendt statistisk test eller model)

— koncentration uden observeret effekt ved hver måling (NOEC)

▼M7

— laveste koncentration med observeret effekt (ved p = 0,05) ved hver måling (LOEC)

— EC_x for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 90 % eller 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentrationsresponskurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse.

Enhver afvigelse fra forsøgsmetoden.

Diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne.

Tabel 1

Fiskearter, som er anbefalet til test

FERSKVAND	BRAKVAND og SALTVAND
Oncorhynchuss mykiss Regnbueørred	*Cyprinodon variegatus* Fårehovedelritse
Pimephales promelas Tykhovedet elritse	Menidia sp. Stribefisk
Danio rerio Zebrafisk	
Oryzias latipes Japansk risfisk	

LITTERATUR

1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

5) Brungs, W. A. og B. R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

8) Kapitel C.20 i dette bilag, *Daphnia magna* formeringstest.

9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of American Statistical Association, 50, 1096-1121.

18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

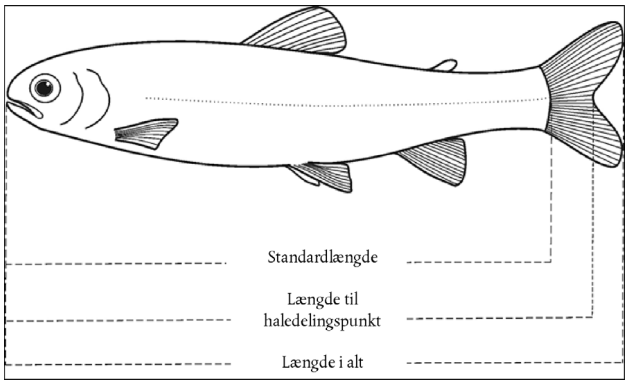
Længde til haledelingspunkt (FL): angiver længden fra snudespids til enden af halefinnens midterste finnestråle og bruges ved fisk, hvor det er svært at afgøre, hvor rygsøjlen ender (www.fishbase.org)

Standardlængde (SL): angiver længden af en fisk målt fra snudespids til bagenden af den sidste hvirvel eller bagenden af den midtlaterale del af hypuralpladen. Denne måling udelukker ganske enkelt halefinnens længde (www.fishbase.org)

Totallængde (TL): angiver længden fra snudespids til halefinnens længste spids, sædvanligvis målt med spidserne komprimeret langs midterlinjen. Det er et lineært mål, og der måles ikke langs kroppens kurve (www.fishbase.org)

Figur 1

Beskrivelse af de forskellige anvendte længder



Kemikalie: et stof eller en blanding

EC_x: (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. EC_{50} er f.eks. en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en defineret eksponeringsperiode

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC): den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt. Tillæg 5 og 6 indeholder retningslinjer

Koncentration uden observeret effekt (NOEC): den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en fastlagt eksponeringstid.

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Den Internationale Union for Ren og Anvendt Kemi).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

▼M7

Tillæg 2

TESTBETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER

ARTER	TESTBETINGELSER			ANBEFALET TESTVARIGHED	Typisk gennemsnitlig minimumstotallængde for kontrolfisk ved forsøgets slutning (mm) (1)	OVERLEVELSE KONTROLLER (minimum)	
	Temperatur (°C)	Saltindhold ($^0/_{00}$)	Lysperiode (timer)			Klækningssucces	Succes efter klækning
Ferskvand:							
Oncorhynchuss mykiss Regnbueørred	10 ± 1,5 (2)		12-16 (3)	To uger, efter at kontrollerne selv indtager foder (eller 60 dage efter klækning)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Tykhovedet elritse	25 ± 1,5		16	32 dage fra forsøgets begyndelse (eller 28 dage efter klækning)	18	70 %	75 %
Danio rerio Zebrafisk	26 ± 1,5		12-16 (4)	30 dage efter klækning	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Japansk risfisk	25 ± 2		12-16 (5)	30 dage efter klækning	17	80 %	80 %
Brakvand og saltvand:							
Cyprinodon variegatus Fårehovedelritse	25 ± 1,5	15-35 (5)	12-16 (4)	32 dage fra forsøgets begyndelse (eller 28 dage efter klækning)	17	75 %	80 %
***Menidia* sp.** Stribefisk	22-25	15-35 (5)	13	28 dage	20	80 %	60 %

Signaturforklaring:

(1) Den typiske gennemsnitlige minimumstotallængde er ikke et validitetskriterium, men afvigelser, der ligger under det angivne tal, bør undersøges nøje i forhold til testens følsomhed. Den gennemsnitlige minimumstotallængde beregnes ud fra en række data, der er tilgængelige på det pågældende tidspunkt.

(2) Afhængigt af hvilken stamme af regnbueørred der testes, kan det være nødvendigt at bruge andre temperaturer. Fisk til yngel skal holdes ved samme temperatur som æggene. Efter modtagelse af æg fra en kommerciel opdrætter er det nødvendigt med en kort tilpasning (f.eks. 1-2 timer) til testtemperaturen efter ankomsten.

(3) Mørke for larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion, siden svagt lys i resten af forsøget (12-16 timers lysperiode) (4).

(4) Lysforholdene bør være konstante under alle testbetingelser.

(5) For hver test foretages dette til ± $2^0/_{00}$.

▼M7

Tillæg 3

VEJLEDNING I FODRING OG HÅNDTERING AF DYR TIL YNGEL OG TESTDYR AF ANBEFALEDE ARTER

ARTER	FODER (*)				OVERFØRSELSTID EFTER KLÆKNING	TID TIL FØRSTE FODRING
	Fisk til yngel	Nyudklækkede larver	Ungfisk			
			Art	Hyppighed		
Ferskvand:						
Oncorhynchuss mykiss Regnbueørred	ørredfoder	ingen ([α])	ørredstartfoder BSN	2-4 fodringer om dagen	14-16 dage efter klækning eller ved swim-up (ikke afgørende)	19 dage efter klækning eller ved swim-up
Pimephales promelas Tykhovedet elritse	BSN, foder i flager og FBS	BSN	BSN48, foder i flager	2-3 gange om dagen	ved klækning på 90 %	2 dage efter klækning
Danio rerio Zebrafisk	BSN, foder i flager	kommercielt larvefoder, protozoer ([β]), protein ([γ])	BSN48, foder i flager,	BSN en gang om dagen foder i flager to gange om dagen	ved klækning på 90 %	2 dage efter klækning
Oryzias latipes Japansk risfisk	foder i flager	BSN, foder i flager (eller protozoer eller rotifera)	BSN48, foder i flager (eller rotifera)	BSN en gang om dagen; foder i flager to gange om dagen eller foder i flager og rotifera en gang om dagen	ikke relevant	6-7 dage efter gydning
Brakvand og saltvand:						
Cyprinodon varieqatus Fårehovedelritse	BSN, foder i flager og FBS	BSN	BSN48	2-3 fodringer om dagen	ikke relevant	1 dag efter klækning/swim-up
***Menidia* sp.** Stribefisk	BSN48, foder i flager	BSN	BSN48	2-3 fodringer om dagen	ikke relevant	1 dag efter klækning/swim-up

Signaturforklaring:

(*) Foder gives til mætning. Overskydende foder og ekskrementer bør fjernes i nødvendigt omfang for at undgå ophobning af affald

FBS frosne saltsøkrebs; voksne *Artemia* sp
BSN saltsøkrebs, nauplii; nyudklækkede
BSN48 saltsøkrebs, nauplii; 48 timer gamle
([α]) larver med blommesæk skal ikke fodres
([β]) filtreret fra blandingskultur
([γ]) granulater fra fermentering

02008R0440 — DA — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Tillæg 4

KEMISKE EGENSKABER AF ACCEPTABELT VAND TIL FORTYNDING

Komponent	Koncentrationsgrænse
Partikler	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Residualt chlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

▼M7

Tillæg 5

STATISTISK VEJLEDNING I BESTEMMELSE AF NOEC

Generelt

Replikatbeholderen er analyseenheden. Med henblik på kontinuerlige målinger, såsom størrelse, beregnes replikatgennemsnittet eller medianen, og disse replikatværdier er de data, der skal analyseres. De anvendte tests power bør påvises, fortrinsvis baseret på en relevant historisk database for hvert laboratorium. Den størrelsesvirkning, der kan påvises med 75-80 % power, bør angives for hvert endepunkt med den statistiske test, der skal bruges.

De databaser, der er tilgængelige på tidspunktet for udviklingen af denne forsøgsmetode, er afgørende for den power, der kan opnås med de anbefalede statistiske metoder. De enkelte laboratorier bør dokumentere deres evne til at opfylde dette krav til power, enten ved at gennemføre deres egne styrkeanalyser eller ved at påvise, at variationskoefficienten (CV, Coefficient of Variation) for hver respons ikke overstiger 90-percentilen for de variationskoefficienter, der blev brugt ved udviklingen af testvejledningen. Tabel 1 angiver disse CV'er. Står der alene gennemsnits- eller medianværdier for replikatet til rådighed, kan man se bort fra CV inden for replikatet.

Tabel 1

90-percentil-CV'er for udvalgte ferskvandsarter

Art	Respons	CV_mellem replikater	CV_inden for replikater
Regnbueørred	Længde	17,4	9,8
	Vægt	10,1	28
Tykhovedet elritse	Længde	16,9	13,5
	Vægt	11,7	38,7
Zebrafisk	Længde	43,7	11,7
	Vægt	11,9	32,8

I næsten alle de statistiske test, der bruges til at evaluere laboratoriers toksikologiske undersøgelser, er det sammenligninger mellem behandlingsgrupper og kontrollen, der er interessante. Det er derfor ikke hensigtsmæssigt at stille krav om en signifikant ANOVA-F-test inden brug af Dunnetts eller Williams' test eller en signifikant Kruskal-Wallis-test inden brug af Jonckheere-Terpstra-testen, Mann-Whitney-testen eller Dunns test (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnetts test har indbygget multiplicitetsjustering, og den forekomst af falsk positive resultater og falsk negative resultater, der er forbundet hermed, påvirkes negativt ved brug af F-testen som gatekeeper. Tilsvarende er step-down Williams- og Jonckheere-Terpstra-test med et signifikansniveau på 0,05 på hvert trin forbundet med en generel forekomst af falsk positive resultater på 5 %, og denne forekomst og testenes power påvirkes negativt ved brug af F- eller Kruskal-Wallis-testen som gatekeeper. Mann-Whitney-testen og Dunns test skal justeres, så der tages højde for multiplicitet. Det anbefales at bruge Bonferroni-Holm-justering.

En omfattende diskussion af de fleste anbefalinger vedrørende hypotesetest og verifikation af de antagelser, der ligger til grund for disse test, findes i OECD (2006), som også indeholder en omfattende bibliografi.

▼M7

Behandling af kontroller, når der anvendes et opløsningsmiddel

Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, bør der både anvendes en kontrol med fortyndingsvand og en opløsningsmiddelkontrol. De to kontroller bør sammenlignes for hver respons og kombineres med henblik på statistisk analyse, hvis der ikke konstateres signifikante forskelle mellem kontrollerne. Ellers anvendes opløsningsmiddelkontrollen til bestemmelse af NOEC eller beregning af EC_x, og vandkontrollen bruges ikke. Se restriktion i validitetskriterierne (punkt 7).

For så vidt angår længde, vægt, andel klækkede æg eller dødelighed for larver eller abnorme larver og første eller sidste dag for klækning eller swim-up, bør T-testen eller Mann-Whitney-testen bruges til sammenligning af kontrollen med fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontrollen ved et signifikansniveau på 0,05, idet der ses bort fra alle behandlingsgrupper. Resultaterne af disse test rapporteres.

Størrelsesmålinger (længde og vægt)

De enkelte fisks længde- og vægtværdier kan være normalfordelt eller log-normalfordelt. Under alle omstændigheder har replikatgennemsnitsværdierne tendens til at være normalt fordelt i kraft af den centrale grænseværdisætning og som bekræftet af data fra langt over 100 ELS-undersøgelser af tre ferskvandsarter. Hvis dataene eller historiske databaser tyder på en log-normal fordeling af de enkelte fisks størrelsesværdier, kan det logaritmiske replikatgennemsnit for de enkelte fisks værdier alternativt beregnes, og de data, der skal analyseres, kan i givet fald være anti-logaritmerne til disse gennemsnitslogaritmer for replikaterne.

Dataene evalueres med hensyn til overensstemmelse med normal fordeling og varianshomogenitet. Med henblik herpå anvendes residualerne fra en variansanalyse med koncentration som den eneste forklarende klassevariabel. Visuel bestemmelse kan foretages ud fra spredningsplot og histogrammer eller stamme-og-blad-plot. Alternativt kan en formel test, f.eks. Shapiro-Wilk eller Anderson-Darling, anvendes. Overensstemmelse med varianshomogenitet kan vurderes ud fra en visuel undersøgelse af samme spredningsplot eller formelt på grundlag af Levenes test. Parametriske test (f.eks. Williams' eller Dunnetts test) skal som de eneste vurderes med hensyn til normalitet eller varianshomogenitet.

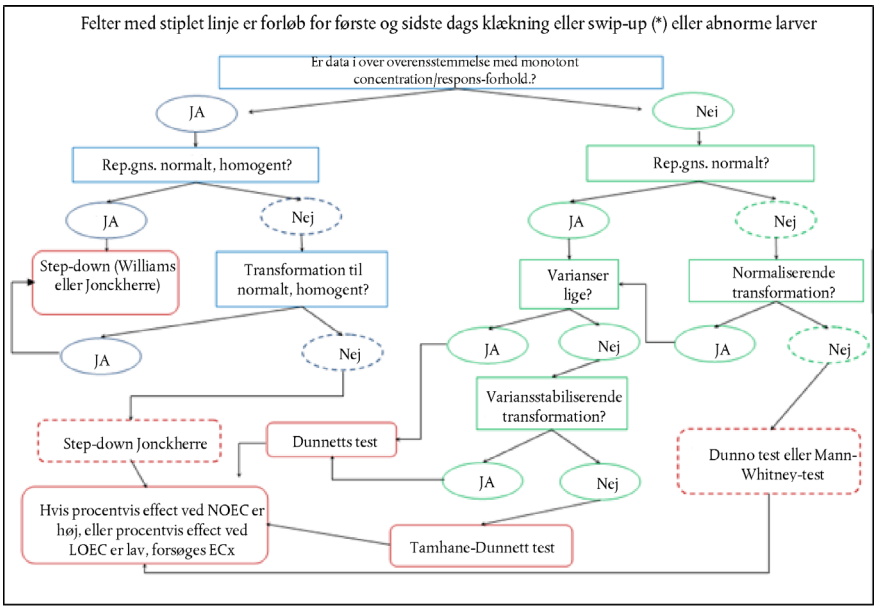
Man bør være opmærksom på mulige afvigende værdier og deres indvirkning på analysen. Tukeys test for afvigende værdier og visuel kontrol af samme diagrammer over residualer som beskrevet ovenfor kan anvendes. Det skal bemærkes, at observationerne er hele replikater, hvilket betyder, at udeladelse af en afvigende værdi fra analysen kun må ske efter omhyggelig afvejning.

De statistiske test, der bruger de særlige kendetegn ved forsøgsdesignet og biologisk forventning, er step-down trend test som f.eks. Williams' test og Jonckheere-Terpstra-testen. Disse test forudsætter et monotont koncentration/respons-forhold, og data bør vurderes med hensyn til overensstemmelse med denne antagelse. Det kan ske visuelt ud fra et spredningsplot af replikatgennemsnittene i forhold til testkoncentrationen. Spredningsplottet kan med fordel suppleres med et stykvist lineært plot, der forbinder koncentrationsgennemsnittene vægtet i forhold til replikatprøvestørrelsen. Stor afvigelse fra monotoni i dette stykvise lineære plot tyder på, at det er nødvendigt at bruge andre test end trend test. Alternativt kan der anvendes formelle test. En enkel formel test er beregning af lineære og kvadratiske kontraster af koncentrationsgennemsnittene. Hvis den kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, er det et tegn på, at der kan være et problem med monotoni, som bør evalueres yderligere ud fra diagrammer. Hvis normalitet eller varianshomogenitet kan være et problem, kan disse kontraster udledes af rangordentransformerede data. Alternative procedurer, såsom Bartholomews test for monotoni, kan anvendes, men tilfører kompleksitet.

▼M7

Figur 2

NOEC-flowdiagram — størrelsesmålinger (længde og vægt)



(*) Disse responser opfylder aldrig forudsætningerne for parametriske analyser eller modeller

Medmindre dataene ikke opfylder betingelserne for disse test, bestemmes NOEC ved hjælp af step-down-anvendelse af Williams' test eller Jonckheere-Terpstra-testen. OECD (2006) indeholder nærmere oplysninger om disse metoder. For så vidt angår data, der ikke opfylder betingelserne for en step-down trend test, kan Dunnetts test eller Tamhane-Dunnett-testen (T3) anvendes. Begge har indbyggede justeringer for multiplicitet. Disse test forudsætter normalitet og, i forbindelse med Dunnetts test, varianshomogenitet. Hvis disse betingelser ikke er opfyldt, kan Dunns ikke-parametriske test anvendes. OECD (2006) indeholder nærmere oplysninger om alle disse test. Figur 2 giver et overblik over, hvordan man finder den foretrukne test.

Klækkede æg og larveoverlevelse

Dataene er andele af æg, der klækkes, eller larver, der overlever, i de enkelte replikater. Disse andele bør vurderes med hensyn til ekstra-binomial varians, som er almindelig, men ikke universel for sådanne målinger. Flowdiagrammet i figur 3 kan bruges til at vælge test; detaljerede beskrivelser findes i teksten.

To test er almindeligt brugt. Der er tale om Tarones C(α)-test (Tarone, 1979) og »chi-i anden-testen«, som anvendes særskilt på hver testkoncentration. Hvis der konstateres ekstra-binomial varians i blot en testkoncentration, bør der anvendes metoder, som tilgodeser dette.

Formel 1

Tarones C(α)-test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

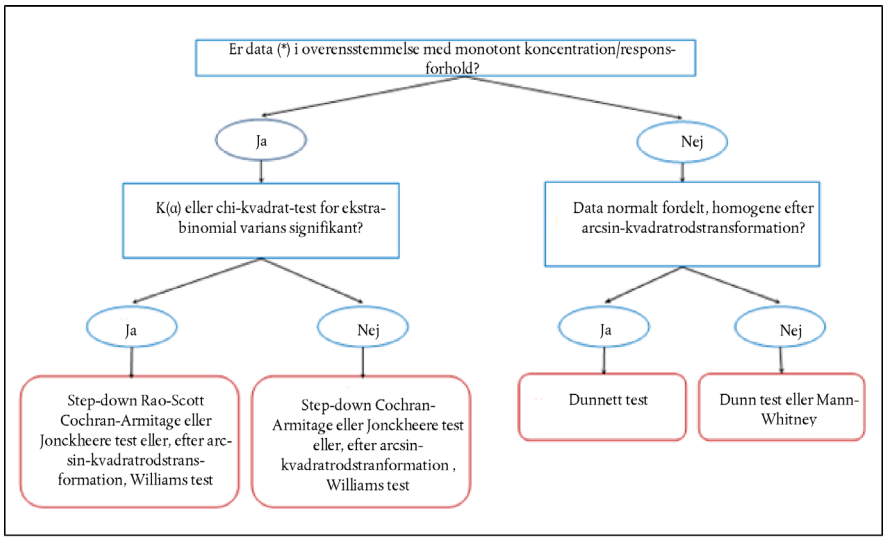
hvor $\hat{p}$ er den gennemsnitlige andel for en given koncentration, **m** er antallet af replikatbeholdere, $\mathbf{n_j}$ er antallet af emner i replikat **j**, og $\mathbf{x_j}$ er antallet af emner i den pågældende replikat med respons, f.eks. ikke udklækkede eller døde. Denne

▼M7

test anvendes særskilt på hver enkelt koncentration. Denne test kan betragtes som en »tilpasset chi-i anden-test«, men begrænsede power-simuleringer med Tarones test har vist, at den er mere velegnet end en »chi-i anden-test«.

Figur 3

NOEC-flowdiagram for klækkede æg og larvedødelighed



(*) Data er replikatandel.

Hvis der ikke er nogen signifikant dokumentation for ekstra-binomial varians, kan step-down Cochran-Armitage-testen anvendes. Denne test tager ikke højde for replikater, så hvis der er dokumentation herfor, tager Rao-Scotts justering af Cochran-Armitage-testen (RSCA) højde for replikater, replikatstørrelser og ekstra-binomial varians og anbefales. Alternative test omfatter step-down Williams- og Jonckheere-Terpstra-test og Dunnetts test som beskrevet for størrelsesmålinger. Disse test finder anvendelse, uanset om der er ekstra-binomial varians, men har en noget lavere power (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, fung *et al.* 1994, 1996).

Første eller sidste dags klækning eller swim-up

Responsen er et heltal, der angiver, hvilken dag i testen den angivne observation er foretaget for en given replikatbeholder. Værdiintervallet er generelt meget begrænset, og der er ofte høje andele af bundne værdier, f.eks. observeres samme første klækningsdag i alle kontrolreplikater og eventuelt i en eller to lave testkoncentrationer. Parametriske test, som Williams' and Dunnetts test, er ikke egnede til sådanne data. Medmindre der er dokumentation for betydelig manglende monotoni, er step-down Jonckheere-Terpstra-testen meget velegnet til at spore testkemikaliets virkninger. I modsat fald kan Dunns test anvendes.

Abnormiteter hos larver

Responsen er antallet af larver med en form for abnormitet. Responsen forekommer ofte sjældent og har visse af de samme problemer som første klækningsdag og udviser undertiden uregelmæssigheder i koncentrationsrespons. Hvis dataene i det mindste nogenlunde følger en monoton koncentrationsform, er step-down Jonckheere-Terpstra-testen velegnet til at påvise virkninger. I modsat fald kan Dunns test anvendes.

▼M7

Henvisninger

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Tillæg 6

STATISTISK VEJLEDNING I REGRESSIONSBEREGNING

Generelt

De observationer, der bruges til fitning af en model, er replikatgennemsnit (længde og vægt) eller replikatandele (klækkede æg og larvedødelighed) (OECD 2006).

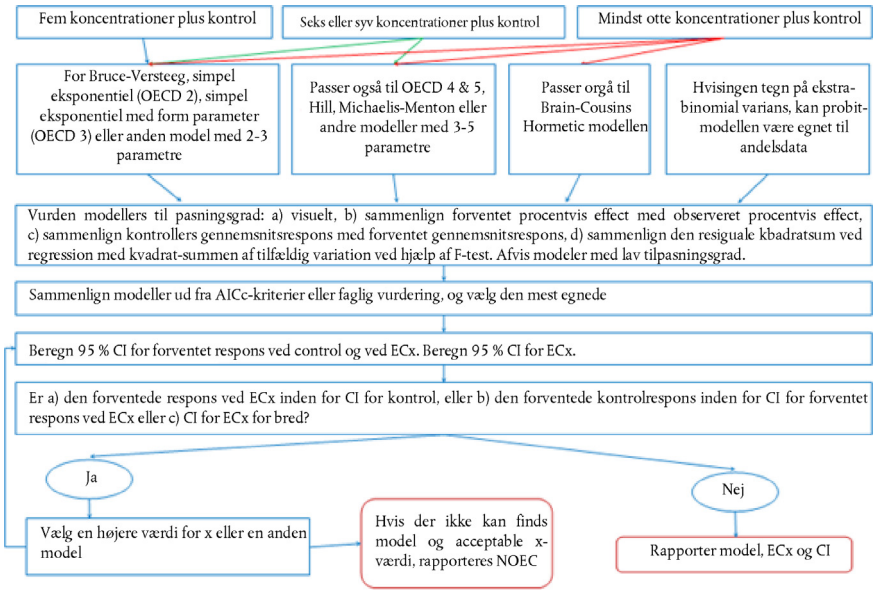
Det anbefales generelt at anvende vægtet regressionsanalyse med replikatprøvestørrelse som vægt. Der kan bruges andre vægtningsmetoder, f.eks. vægtning i forhold til forventet gennemsnitsrespons eller en kombination af denne og replikatprøvestørrelsen. Vægtning i forhold til den reciprokke værdi for variansen i koncentrationsprøven anbefales ikke (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Enhver transformation af responser inden analysen bør sikre observationernes uafhængighed, og ECx og denne værdis konfidensgrænser bør udtrykkes i de oprindelige måleenheder og ikke de transformerede enheder. En ændring på 20 % i logaritmen for længde svarer f.eks. ikke til en ændring på 20 % i længde (Lyles *et. al* 2008, Draper and Smith 1999).

Flowdiagrammet i figur 4 giver et overblik over beregninger af EC_x. De nærmere detaljer er beskrevet i teksten nedenfor.

Figur 4

Flowdiagram for EC_x-beregning af replikatgennemsnit (længde, vægt eller andel af klækkede æg eller larvedødelighed); flere oplysninger findes i teksten.



Betragtninger om klækkede æg og larvedødelighed

For så vidt angår klækkede æg og larvedødelighed, er det generelt bedst at benytte en faldende model til fitning, medmindre man benytter en probit-modelfitning som beskrevet nedenfor. Dvs. at der bør opstilles en model for andelen af æg, der ikke klækker, eller larver, der dør. Årsagen er, at ECx henviser til en koncentration, hvor der er en ændring svarende til x % af kontrollernes gennemsnitsrespons. Hvis 5 % af kontrolæggene ikke klækker, og modellen er manglende klækning, henviser EC20 til en koncentration, hvor der er en ændring svarende til 20 % af de 5 % manglende klækning i kontrollen, dvs. en ændring på 0,2 × 0,05=0,01 eller 1 procentpoint til 6 % manglende klækning. En så lille ændring kan ikke beregnes på en meningsfuld måde ud fra de tilgængelige data og er ikke biologisk vigtig. Hvis der opstilles en model for andelen af æg, der klækker, ville kontrolandelen i dette eksempel være 95 %, og en reduktion på

▼M7

20 % i forhold til kontrolgennemsnittet ville være en ændring på 0,95 × 0,2=0,18, dvs. fra en klækningssucces på 95 % til en klækningssucces på 77 % (= 95 – 18), og denne effektkoncentration kan beregnes og er formodentlig af større interesse. Dette er ikke et problem med størrelsesmålinger, selv om skadelige virkninger på størrelsen normalt indebærer et fald i størrelsen.

Modeller for størrelse (længde eller vægt) og ægklækningssucces eller larveoverlevelse

Med undtagelse af Brain-Cousens hormetiske model er alle disse modeller beskrevet og anbefalet i OECD (2006). De såkaldte OECD 2-5-modeller drøftes også i forbindelse med økotoksicitetsforsøg i Slob (2002). Der findes selvfølgelig mange andre modeller, som kan være nyttige. Bunke, *et al*. (1999) nævner mange modeller, der ikke er medtaget her, og indeholder mange henvisninger til andre modeller. Dem, der er anført nedenfor, angives som særligt velegnede i forbindelse med økotoksicitetsforsøg, og anvendelse heraf er udbredt.

Med fem testkoncentrationer plus kontrol

— Bruce-Versteeg

— Simpel eksponentiel (OECD 2)

— Eksponentiel med formparameter (OECD 3)

— Simpel eksponentiel med nedre grænse (OECD 4)

Mindst seks testkoncentrationer plus kontrol

— Eksponentiel med formparameter og nedre grænse (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Hvis der er synlige tegn på hormese (usandsynligt med ægklækningssucces eller larveoverlevelse, men observeres undertiden i størrelsesobservationer)

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989).

Alternative modeller for manglende ægklækning og larvedødelighed

— Modellering af stigende responser kan ske ved fitning af data ved hjælp af probit (eller logistiske) modeller, hvis der ikke er tegn på ekstra-binomial varians, og hvis kontrolforekomsten er estimeret i modelfitningen. Det er ikke den foretrukne metode, eftersom den behandler individet, og ikke replikatet, som analyseenhed (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

En enkelt models grad af egnethed

— Sammenlign observeret og forventet procentvist fald visuelt for hver testkoncentration (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

— Sammenlign den gennemsnitlige kvadratafvigelse ved regression med den gennemsnitlige kvadratafvigelse for tilfældig variation ved hjælp af en F-test (Draper and Smith 1999).

— Kontroller, at alle udtryk i modellen er signifikant forskellige fra nul (dvs. bestem, om alle modeludtryk er vigtige) (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼M7

— Diagrammer over residualer fra regression i forhold til testkoncentration, eventuelt i log(konc)-målestok. Der bør ikke være noget mønster i diagrammet; punkterne bør være tilfældigt spredt omkring en vandret linje i en højde på nul.

— Dataene bør vurderes med hensyn til normalitet og varianshomogenitet på samme måde som angivet i tillæg 5.

— Derudover bør residualernes normalitet i forhold til regressionsmodellen vurderes med samme metoder som angivet i tillæg 5 for residualerne fra variansanalysen.

Sammenlign modeller

— Brug Akiakes AICc-kriterier. Lavere AICc-værdier angiver et bedre fit, og hvis AICc(B)-AICc(A)≥10, er model A næsten altid bedre end model B (Motulsky and Christopoulos (2004)).

— Sammenlign de to modeller visuelt med hensyn til, hvor godt de opfylder ovenstående kriterier for en enkelt model.

— Sparsommelighedsprincippet anbefales, dvs. at den mest enkle model, der i rimeligt omfang er fit til data, anvendes (Ratkowsky 1993, Lyles et. al 2008).

EC_x-beregningens kvalitet

Konfidensintervallet (CI) for EC_x må ikke være for bredt. Der skal anvendes statistiske skøn til at beslutte, hvor bredt konfidensintervallet må være, hvis EC_x-værdien stadig skal kunne bruges. Simuleringer af regressionsmodeller, der er fit til ægklæknings- og størrelsesdata, viser, at konfidensintervaller på ca. 75 % for EC_x (x=10, 20 eller 30) ikke dækker mere end to testkoncentrationer. Dette giver generelle retningslinjer for, hvad der kan accepteres, og praktiske retningslinjer for, hvad der kan lade sig gøre. Flere forfattere bekræfter, at det er nødvendigt at rapportere konfidensintervaller for alle modelparametre, og at brede konfidensintervaller for modelparametre er et tegn på, at modellen ikke er acceptabel (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

Konfidensintervallet for EC_x (eller enhver anden modelparameter) må ikke omfatte nul (Motulsky and Christopoulos 2004). Det er den regression, der svarer til den minimale signifikante forskel, som ofte er nævnt i hypoteseforsøgsmetoder (f.eks. Wang *et al.* 2000). Det svarer også til det konfidensinterval for gennemsnitlige responser ved LOEC, som ikke omfatter kontrolgennemsnittet. Man må overveje, om parameterestimaterne er videnskabeligt plausible. Hvis konfidensintervallet for y0 f.eks. er ± 20 %, er intet EC_{10}-estimat plausibelt. Hvis modellen forudsiger en effekt på 20 % ved en koncentration C, og den højeste observerede effekt ved C og lavere koncentrationer er 10 %, er EC_{20} ikke plausibel (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x må ikke kræve ekstrapolering uden for intervallet af positive koncentrationer (Draper and Smith 1999, OECD 2006). En generel retningslinje kan f.eks. være, at EC_x ikke må ligge mere end ca. 25 % under den laveste koncentration, der testes, eller over den højeste koncentration, der testes.

Henvisninger

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ASSAY FOR FISKS REPRODUKTION PÅ KORT SIGT

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 229 (2012). Behovet for at udvikle og validere et assay med fisk, der kan opspore hormonforstyrrende kemikalier, udspringer af bekymringer om, at kemikalie-koncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv som følge af disse kemikaliers interaktion med det endokrine system. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en testvejledning til screening af kemikalier, der påvirker hvirvelløse fiske-arters endokrine system. Assayet for fisks reproduktion på kort sigt gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser mellem laboratorier med udvalgte kemikalier med henblik på at påvise assayets relevans og pålidelighed for sporing af kemikalier, der påvirker reproduktionen hos fisk via forskellige mekanismer, herunder via det endo-krine system (1, 2, 3, 4, 5). Alle endepunkter i OECD-testvejledningen er blevet valideret på tykhovedet elritse, og en delmængde af endepunkter er blevet valideret på japansk risfisk (vitellogenin og sekundære kønskarakteri-stika) og zebrafisk (vitellogenin). Valideringsarbejdet har været genstand for en peer review foretaget dels af et panel af eksperter udnævnt af the National Coordinators of the Test Guideline Programme (6) (de nationale koordina-torer af testvejledningsprogrammet) og dels af et uafhængigt panel af eksperter bestilt af United States Environmental Protection Agency (29) (USA's miljøstyrelse). Assayet er ikke egnet til at identificere specifikke hormonforstyrrende mekanismer, fordi testdyrene har en intakt hypothalamus-hypofyse-gonadeakse (HPG), som kan reagere på kemikalier, der har indvirkning på HPG-aksen på forskellige niveauer.

2. I nærværende forsøgsmetode beskrives et in vivo-screeningsassay, hvor kønsmodne hanfisk og gydende hunfisk holdes sammen og eksponeres for et kemikalie i en begrænset del af deres livscyklus (21 dage). Ved afslut-ningen af eksponeringsperioden på 21 dage måles to biomarkørendepunkter hos hanner og hunner som indikatorer på testkemikaliets hormonforstyrrende aktivitet; disse endepunkter er vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Vitellogenin måles hos tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafisk, hvor-imod sekundære kønskarakteristika kun måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk. Desuden overvåges den kvantitative frugtbarhed dagligt under hele forsøget. Kønskirtlerne præserveres også, og histopatologien evalueres eventuelt med henblik på at vurdere forsøgsdyrenes formerings-evne og give de øvrige endepunkter større vægt (»weight of evidence«).

3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningassay for formeringsevne, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (30). I denne konceptramme ligger assayet for fisks reproduktion på kort sigt på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Vitellogenin (VTG) produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som respons på cirkulerende endogent østrogen. Det er en præcursor for æggeblommeproteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som udvikles. Vitellogenin er stort set ikke-detekterbart i plasma hos umodne hun- og hanfisk, fordi de ikke har tilstrækkeligt cirkulerende østrogen; leveren kan dog syntetisere og udskille vitellogenin som respons på stimu-lering fra eksogent østrogen.

▼M7

5. Målingen af vitellogenin benyttes til at afdække kemikalier med forskellige østrogene virkemåder. Afdækning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af vitellogenininduktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer reviews (f.eks. (7)). Vitellogenininduktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgener (8, 9). En reduktion i niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17β-østradiol, forårsager et fald i VTG-niveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (10, 11). Den biologiske relevans af vitellogeninresponsen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og bredt dokumenteret. Det er dog muligt, at produktion af vitellogenin hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-endokrine toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet.

6. Flere målemetoder til rutinebrug er blevet udviklet og standardiseret. Det gælder artsspecifikke enzymkoblede immunadsorptionsteknikker (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)), hvor der bruges immunkemi til kvantificering af VTG produceret i små blod- eller leverprøver indsamlet fra enkeltfisk (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Der udtages prøver af blod fra tykhovedet elritse, blod eller hoved/hale-homogenat fra zebrafisk og lever fra japansk risfisk med henblik på vitellogeninmåling. Hos japansk risfisk er der en god sammenhæng mellem vitellogenin målt fra blod og fra lever (19). Tillæg 6 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til VTG-analyse. Kit til måling af VTG er let tilgængelige; sådanne kit bør være baseret på en valideret artsspecifik ELISA-metode.

7. Sekundære kønskarakteristika for hanner af visse arter er synlige udvendigt, kan kvantificeres og reagerer på cirkulerende niveauer af endogene androgener; det er tilfældet for tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke for zebrafisk, som ikke har kvantificerbare sekundære kønskarakteristika. Hunner bevarer evnen til at udvikle sekundære kønskarakteristika for hanner, når de eksponeres for androgene kemikalier i vand. Flere undersøgelser i den videnskabelige litteratur dokumenterer denne type respons hos tykhovedet elritse (20) og japansk risfisk (21). Et fald i sekundære kønskarakteristika hos hanner bør fortolkes med forsigtighed på grund af den lave statistiske power og bør være baseret på en ekspertvurdering og vægten af evidens. Der er begrænsninger, for så vidt angår brugen af zebrafisk i dette assay, på grund af fraværet af kvantificerbare sekundære kønskarakteristika, som reagerer på kemikalier med androgene virkninger.

8. Hos tykhovedet elritse er den primære indikator på eksogen androgen eksponering antallet af legevorter på hunfiskens snude. Hos japansk risfisk udgør antallet af papillære strukturer hovedmarkøren for eksogen eksponering for androgene kemikalier hos hunfisk. Tillæg 5A og tillæg 5B indeholder oplysninger om de anbefalede fremgangsmåder til vurdering af kønskarakteristika hos henholdsvis tykhovedet elritse og japansk risfisk.

9. 21-dages assayet med fisk omfatter en vurdering af kvantitativ ægproduktion og præservering af kønskirtlerne med henblik på valgfri histopatologisk undersøgelse. Dette supplerende endepunkt kan være et krav fra visse tilsynsmyndigheder med henblik på en mere fyldestgørende vurdering af forsøgsdyrenes formeringsevne eller i tilfælde, hvor vitellogenin og de sekundære kønskarakteristika ikke reagerer på kemisk eksponering. Selv om nogle endepunkter i høj grad kan være diagnostiske (f.eks. VTG-induktion hos hanfisk og udvikling af vorter hos hunfisk), er ikke alle endepunkter (f. eks. frugtbarhed og histopatologi for kønskirtler) i assayet beregnet til entydigt at identificere specifikke cellulære virkningsmekanismer. I stedet kan man ud fra rækken af endepunkter, samlet set, drage konklusioner om mulige hormonforstyrrende virkninger og dermed udstykke retningslinjer for yderligere forsøg. Selv om endepunktet frugtbarhed ikke er specifikt for hormonforstyrrelser, er det, på grund af sin påviste følsomhed ved kendte hormonforstyrrende kemikalier (5), et vigtigt endepunkt, eftersom man, når

▼M7

dette og andre endepunkter er upåvirkede, i højere grad kan være sikker på, at en forbindelse sandsynligvis ikke er hormonforstyrrende. Når frugtbarheden er påvirket, vil dette endepunkt imidlertid veje tungt i »weight of evidence«-slutninger. Vejledning i fortolkning af data og accept af testresultater findes nedenfor i denne forsøgsmetode.

10. Definitioner anvendt i denne forsøgsmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

11. I assayet eksponeres han- og hunfisk i reproduktiv tilstand sammen i testbeholderne. Deres voksne og reproduktive tilstand gør det muligt klart at skelne mellem kønnene og dermed foretage en kønsrelateret analyse af hvert endepunkt og sikrer, at de er følsomme over for eksogene kemikalier. Ved testens afslutning bekræftes kønnet ved undersøgelse af kønskirtlerne i makroskop efter åbning af abdomen gennem bugen med en saks. Tillæg 2 indeholder en oversigt over de relevante betingelser for bioassayet. Assayet indledes normalt med fisk udtaget fra en bestand i gydningstilstand; der må ikke bruges senescerende dyr. Retningslinjer for fiskens alder og reproduktive tilstand findes i afsnittet om valg af fisk. Assayet udføres med tre eksponeringskoncentrationer af kemikaliet samt en vandkontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Der bruges to beholdere eller replikater pr. behandling ved zebrafisk (hver beholder indeholder fem hanner og fem hunner). Der bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling ved tykhovedet elritse (hver beholder indeholder to hanner og fire hunner). Det sker med henblik på tilpasning til tykhovedet elritse-hannens territoriale adfærd og for samtidig at sikre tilstrækkelig power i assayet. Der bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling ved japansk risfisk (hver beholder indeholder tre hanner og tre hunner). Eksponeringen varer 21 dage, og prøveudtagningen af fisk sker på eksponeringens dag 21. Den kvantitative frugtbarhed overvåges dagligt.

12. Ved prøveudtagningen på dag 21 aflives alle dyr på en human måde. Sekundære kønskarakteristika måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk (se tillæg 5A og tillæg 5B); der tages blodprøver til bestemmelse af VTG hos zebrafisk og tykhovedet elritse; alternativt kan hoved/hale indsamles til bestemmelse af VTG hos zebrafisk (tillæg 6); der indsamles lever med henblik på analyse af VTG hos japansk risfisk (tillæg 6); kønskirtlerne fikseres enten hele eller dissekerede med henblik på eventuel histopatologisk evaluering (22).

KRITERIER FOR ACCEPT AF TEST

13. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:

— Dødeligheden i vandkontrollerne (eller opløsningsmiddelkontrollerne) må ikke overstige 10 % ved afslutningen af eksponeringsperioden.

— Koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele eksponeringsperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV).

— Vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end ± 1,5 °C mellem testbeholderne og må ikke afvige med mere end 2 °C fra de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 2).

— Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

▼M7

— Der skal være dokumentation for, at fisken aktivt gyder i alle replikater før eksponering for kemikaliet og i kontrolreplikater under testen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

14. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

a. ilt- og pH-måleudstyr

b. udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

c. egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning

d. beholdere fremstillet af et kemisk inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 2)

e. gydningssubstrat til tykhovedet elritse og zebrafisk; de nødvendige oplysninger findes i tillæg 4.

f. vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0,5 mg).

Vand

15. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på ± 0,5 pH-enheder. For at sikre at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} og SO_4^{2-}), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 3 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

16. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Saturation colums (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærestof. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, skal der anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne. Ved kemikalier, der er vanskelige at teste, kan et opløsningsmiddel være den teknisk bedste løsning; nærmere oplysninger findes i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (23). Valget af opløsningsmiddel afgøres af stoffets eller blandingens kemiske egenskaber. OECD's vejledning anbefaler maksimalt 100 µl/l, hvilket skal overholdes. En gennemgang for nylig (24) fremhævede dog yderligere bekymringer i forbindelse med brug af opløsningsmidler til test af hormonforstyrrelser. Det anbefales derfor, at opløsningsmiddelkoncentrationen om nødvendigt minimeres, når det er teknisk muligt (afhængigt af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber).

▼M7

17. Der anvendes et testsystem med gennemstrømning. Et sådan system doserer og fortynder kontinuerligt en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en serie af koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. Der skal udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer af lavere kvalitet undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier. Ved valg af materiale til gennemstrømningssystemet bør der tages højde for den eventuelle adsorption af testkemikaliet til dette materiale.

Opbevaring af fiskene

18. Testfisk udvælges fra en laboratoriepopulation, fortrinsvis fra en enkelt bestand, som i mindst to uger forud for testen akklimatiseres under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden (definitioner i tillæg 1) er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 2).

19. Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

— dødelighed på over 10 % af populationen efter syv dage: hele fiskegruppen forkastes

— dødelighed på mellem 5 og 10 % af populationen: akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage; hvis der er mere end 5 % dødelighed i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— dødelighed på mindre end 5 % af populationen på syv dage: fiskegruppen accepteres.

20. Fiskene må ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden, i præeksponeringsperioden eller i eksponeringsperioden.

Præeksponering og valg af fisk

21. Der anbefales en præeksponeringsperiode på 1-2 uger, hvor dyrene anbringes i beholdere svarende til dem, der anvendes i den egentlige test. Fisk fodres ad libitum gennem hele opbevaringsperioden og i eksponeringsfasen. Eksponeringsfasen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr (f.eks. med tydelige synlige sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk), som er aktivt gydende. Som generel vejledning (og ikke isoleret ud fra observationen af en given fiskegruppes faktiske reproduktive tilstand) bør tykhovedet elritse være ca. 20 (±2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 ±2 °C i hele deres levetid. Japanske risfisk bør være ca. 16 (±2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 ±2 °C i hele deres levetid. Zebrafisk bør være ca. 16 (±2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 26 ±2 °C i hele deres levetid. Ægproduktion bør vurderes dagligt i præeksponeringsfasen. Det anbefales, at gydningen observeres i alle replikatbeholdere forud for optagelse i assayets eksponeringsfase. Der kan ikke opstilles kvantitative retningslinjer for ønskelig daglig ægproduktion i denne fase, men det er forholdsvis udbredt at observere gennemsnitlige gydninger på > 10 æg/hun/dag for hver art. Der bør anvendes et randomiseret blok-design i forhold til ægproduktionen for at allokere replikater til de forskellige testniveauer for at sikre en afbalanceret fordeling af replikater.

▼M7

TESTDESIGN

22. Der bruges tre koncentrationer af testkemikaliet, en kontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Dataene kan analyseres for at bestemme statistisk signifikante forskelle mellem behandlings- og kontrolresponser. Disse analyser bruges i højere grad til at vurdere, om der er brug for yderligere længerevarende test af kemikaliets skadelige virkninger (navnlig overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion), end til risikovurdering (25).

23. Når der bruges zebrafisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (fem hanner og fem hunner i hver af de to replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin. Når der bruges japansk risfisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (tre hanner og tre hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Når der bruges tykhovedet elritse, udtages der på eksponeringens dag 21 hanner og hunner (to hanner og fire hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Der skal foretages en kvantitativ vurdering af frugtbarheden, og væv fra kønskirtlerne fikseres enten som helhed eller dissekerede med henblik på eventuel histopatologisk evaluering, om nødvendigt.

Udvælgelse af testkoncentration

24. I denne test fastsættes den højeste testkoncentration til den maksimalt tolererede koncentration (MTC) bestemt ud fra test til bestemmelse af dosisinterval eller andre toksicitetsdata eller 10 mg/l eller den maksimale opløselighed i vand, alt efter hvilken der er lavest. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger eksisterende empiriske data om akut toksicitet eller andre toksicitetsdata, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC.

25. Der skal benyttes tre testkoncentrationer med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 10, og en fortyndingsvandkontrol (og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol). Det anbefales at benytte en afstandsfaktor på mellem 3,2 og 10.

FREMGANGSMÅDE

Udvælgelse og vejning af testfisk

26. Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved assayets begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i tillæg 2. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for det relevante køn. Det anbefales at veje en delprøve af fiskebestanden inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Eksponeringsbetingelser

Varighed

27. Testens varighed er 21 dage efter en præeksponeringsperiode. Den anbefalede præeksponeringsperiode er 1-2 uger.

Fodring

28. Fiskene fodres ad libitum med et passende foder (tillæg 2) og tilstrækkeligt ofte til at bevare kropstilstanden. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. Som hovedregel kan den daglige ration opdeles i to eller tre lige store portioner til flere fodringer om dagen med

▼M7

mindst tre timers interval. En større ration kan accepteres, navnlig i weekender. Fiskene bør ikke fodres i 12 timer inden prøveudtagning/makroskopisk undersøgelse.

29. Fiskefoder evalueres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af fytoøstrogener, som ville kompromittere assayets respons på en kendt østrogenagonist (f.eks. østradiol-17b), bør undgås.

30. Foderrester og fækalt materiale skal fjernes fra testbeholderne mindst to gange om ugen f.eks. ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af en sifon.

Lys og temperatur

31. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i forsøget (se tillæg 2).

Hyppighed af analyser og målinger

32. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikalietilførselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder skal være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikalie regelmæssigt som følger: Gennemstrømningshastigheden for fortyndingsmidlet og giftstofstamopløsningen kontrolleres fortrinsvis dagligt, men som minimum to gange om ugen, og må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Det anbefales, at de faktiske testkemikaliekoncentrationer måles i alle beholdere ved testens begyndelse og efterfølgende ugentligt.

33. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.

34. Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Hvis det er nødvendigt, anbefales centrifugering. men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.

35. I løbet af testen skal opløst ilt, temperatur og pH måles i alle testbeholderne mindst en gang om ugen. Samlet hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles i kontrolbeholderne og i en beholder med den højeste koncentration mindst en gang om ugen. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

36. En række generelle (f.eks. overlevelse) og biologiske responser (f.eks. VTG-niveauer) vurderes i løbet af assayet eller ved afslutningen af assayet. Der skal foretages en kvantitativ overvågning af frugtbarheden dagligt. Måling og evaluering af disse endepunkter og deres anvendelse er beskrevet nedenfor.

Overlevelse

37. Fiskene undersøges dagligt i testperioden, eventuel dødelighed registreres, og den døde fisk fjernes så hurtigt som muligt. Døde fisk erstattes hverken i kontrol- eller testbeholderne. Kønnet for fisk, der dør under testen, bestemmes ved makroskopisk undersøgelse af kønskirtlerne.

▼M7

Adfærd og udseende

38. Enhver unormal adfærd (i forhold til kontrollerne) registreres; det kan omfatte tegn på generel toksicitet, herunder hyperventilation, ukoordineret svømning, tab af ligevægt og atypisk ubevægelighed eller fouragering. Yderligere ydre abnormaliteter (f.eks. blødning, misfarvning) registreres. Sådanne tegn på toksicitet bør overvejes nøje i forbindelse med fortolkningen af data, da de kan være et tegn på koncentrationer, hvor biomarkører for hormonforstyrrelser ikke er pålidelige. Sådanne adfærdsmæssige observationer kan også være nyttige kvalitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til test med fisk. Eksempelvis er der observeret territorial aggressivitet hos normale hanner eller maskuliniserede hunner hos tykhovedet elritse under androgen eksponering; hos zebrafisk reduceres eller hindres den karakteristiske parrings- eller gydningsadfærd efter daggry ved østrogen eller antiandrogen eksponering.

39. Fordi visse aspekter af udseendet (primært farven) kan ændre sig hurtigt ved håndtering, er det vigtigt, at kvalitative observationer foretages, inden dyrene fjernes fra testsystemet. Tidligere erfaringer med tykhovedet elritse tyder på, at visse hormonforstyrrende kemikalier i første omgang kan forårsage ændringer i følgende ydre karakteristika: kropsfarve (lys eller mørk), farvemønstre (lodrette bånd) og kropsform (hoved- og brystområde). Derfor bør fiskenes fysiske udseende observeres i løbet af testen og ved afslutningen af undersøgelsen.

Frugtbarhed

40. Daglige kvantitative observationer af gydning bør registreres pr. replikat. Ægproduktionen registreres som antallet af æg/overlevende hun/dag pr. replikat. Æg fjernes dagligt fra testkamrene. Gydningssubstrater anbringes i testkammeret for tykhovedet elritse og zebrafisk for at sikre, at fiskene kan gyde under normale forhold. Tillæg 4 indeholder nærmere oplysninger om anbefalede gydningssubstrater til zebrafisk (tillæg 4A) og tykhovedet elritse (tillæg 4B). Det anses ikke for nødvendigt at anvende gydningssubstrat til japansk risfisk.

Human aflivning af fisk

41. På dag 21, dvs. ved eksponeringens afslutning, aflives fiskene med passende mængder tricain (tricainmethansulfonat), metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l bufret med 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne; blod eller væv udtages derefter med henblik på bestemmelse af VTG som forklaret i punktet om vitellogenin.

Observation af sekundære kønskarakteristika

42. Visse hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage ændringer i specialiserede sekundære kønskarakteristika (antal legevorter hos tykhovedet elritse-hanner, papillære strukturer hos japansk risfisk-hanner). Kemikalier med visse virkemåder kan navnlig forårsage abnormal forekomst af sekundære kønskarakteristika hos dyr af det modsatte køn; eksempelvis kan androgene receptoragonister, som trenbolon, methyltestosteron og dihydrotestosteron, få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle fremtrædende legevorter eller japansk risfisk-hunner til at udvikle papillære strukturer (11, 20, 21). Det er også blevet beskrevet, at østrogenreceptoragonister kan reducere antallet af legevorter og størrelsen af nakkefremspringet hos voksne hanner af arten tykhovedet elritse (26, 27). Sådanne makroskopiske morfologiske observationer kan også være nyttige kvalitative og kvantitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til test med fisk. Antallet og størrelsen af legevorter hos tykhovedet elritse og papillære strukturer hos japansk risfisk kan kvantificeres direkte eller mere praktisk hos præserverede

▼M7

dyr. Anbefalede fremgangsmåder til evaluering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk findes i henholdsvis tillæg 5A og tillæg 5B.

Vitellogenin (VTG)

43. Blod indsamles fra halearterien/-venen med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør eller alternativt ved hjertepunktur med en kanyle. Afhængigt af fiskens størrelse kan der generelt indsamles 5-60 µl blod pr. individ hos tykhovedet elritse og 5-15 µl pr. individ hos zebrafisk. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering og opbevares med proteaseinhibitorer ved – 80 °C, indtil det skal undersøges for VTG. Alternativt bruges leveren hos japansk risfisk og hoved-/halehomogenat hos zebrafisk som kilde til væv til bestemmelse af VTG (tillæg 6). VTG-målingen skal være baseret på en valideret homolog ELISA-metode, og der skal anvendes en homolog VTG-standard og homologe antistoffer. Det anbefales at bruge en metode, hvor der kan påvises VTG-niveauer så lave som nogle få ng/ml plasma (eller ng/mg væv), som er baggrundsniveauet hos ikke-eksponerede hanfisk.

44. Kvalitetskontrol af VTG-analyse sker ved brug af standarder, blindprøver og mindst duplikate analyser. For hver ELISA-metode gennemføres en test for matrixeffekt (effekt af prøveopløsning) for at bestemme minimumsfaktoren for prøveopløsningen. Hver ELISA-plade, der bruges til VTG-assay, skal omfatte følgende kvalitetskontrolprøver: mindst seks kalibreringsstandarder, som omfatter det forventede interval af VTG-koncentrationer, og mindst en ikke-specifik bindingsassayblindprøve (analyseres i duplikat). Disse blindprøvers absorbans bør være under 5 % af den maksimale kalibreringsstandardabsorbans. Der analyseres mindst to alikvoter (duplikater i brønde) af hver prøveopløsning. Duplikater i brønde, som afviger med mere end 20 %, analyseres igen.

45. Korrelationskoefficienten (R^2) for kalibreringskurverne bør være større end 0,99. En høj korrelation er imidlertid ikke nok til at garantere tilstrækkelig forudsigelse af koncentrationen i alle intervaller. Ud over at have en tilstrækkelig høj korrelation for kalibreringskurven, bør koncentrationen for hver standard, som beregnet på grundlag af kalibreringskurven, være 70-120 % af den nominelle koncentration. Hvis de nominelle koncentrationer afviger fra kalibreringsregressionslinjen (f.eks. ved lavere koncentrationer), kan det være nødvendigt at opdele kalibreringskurven i lave og høje intervaller eller bruge en ikke-lineær model til en passende fitning af absorbansdataene. Hvis kurven er opdelt, bør R^2 for begge linjesegmenter være > 0,99.

46. Detektionsgrænsen (LOD) defineres som koncentrationen af den laveste analytiske standard, og kvantificeringsgrænsen (LOQ) defineres som den laveste analytiske standard ganget med den laveste fortyndingsfaktor.

47. På hver dag, hvor der gennemføres VTG-assay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet (tillæg 7). Forholdet mellem den forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert assaysæt gennemført på den pågældende dag.

Histopatologisk evaluering af kønskirtlerne

48. Tilsynsmyndighederne kan stille krav om en histopatologisk undersøgelse for at undersøge målorganet på HPG-aksen efter eksponering for kemikaliet. I denne henseende fikseres kønskirtlerne enten som helhed eller dissekerede. Når der stilles krav om histopatologisk undersøgelse, søges der efter specifikke endokrinrelaterede responser i kønskirtlerne i forbindelse med vurderingen af testkemikaliets hormonforstyrrende virkning. Disse diagnostiske

▼M7

responser omfatter hovedsagelig forekomsten af oocyter i testiklerne, Leydig-cellehyperplasi, reduceret blommedannelse, øgede spermatogonier og perifollikulær hyperplasi. Andre kønskirtellæsioner som oocytatresi, beskadigelse af testiklerne og fasebetingede ændringer kan have forskellige årsager. I vejledningen om histopatologiske undersøgelser af fisk beskrives de fremgangsmåder, der anvendes til dissekering, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne (22).

DATA OG RAPPORTERING

Evaluering af biomarkørresponser ved variansanalyse (ANOVA)

49. For at identificere et kemikalies potentielle virkning sammenlignes responser for henholdsvis behandlinger og kontrolgrupper ved variansanalyse (ANOVA). Når der bruges en opløsningsmiddelkontrol, udføres en passende statistisk test til sammenligning af fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontroller for hvert endepunkt. Vejledning i hvordan data om fortyndingsvand og opløsningsmiddel håndteres i den efterfølgende statistiske analyse, findes i OECD, 2006c (28). Alle data om biologisk respons analyseres og registreres særskilt i rapporten fordelt på køn. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normalfordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts eller Levenes test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA. Dunnetts test (parametrisk) på flere parvise sammenligninger eller Mann-Whitney-testen med Bonferroni-justering (ikke-parametrisk) kan bruges til ikke-monotont dosis/respons-forhold. Der kan bruges andre statistiske test (f.eks. Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test), hvis dosis/respons-forholdet omtrent er monotont. Tillæg 8 indeholder et statistisk flowdiagram, som kan hjælpe med at træffe beslutning om, hvilken statistisk test der er mest egnet. Der kan desuden findes yderligere oplysninger i OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (28).

Rapportering af testresultater

50. Undersøgelsesdataene skal omfatte:

Testlaboratorium

— Ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar

— Hvert laboratorium skal have dokumenteret kendskab til en række repræsentative kemikalier.

Testkemikalie:

— Karakterisering af testkemikalie

— Fysisk form og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— Klargøring af testkoncentrationer: metode og frekvens

— Information om stabilitet og bionedbrydelighed.

Opløsningsmiddel:

— Karakterisering af opløsningsmiddel (form, anvendt koncentration)

— Begrundelse for valg af opløsningsmiddel (hvis andet end vand).

▼M7

Testdyr:

— Art og stamme

— Leverandør og særlig leverandør

— Fiskens alder ved begyndelsen af testen og reproduktiv tilstand/gydningstilstand

— Oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr

— Fiskenes kropsvægt ved eksponeringsperiodens start (fra en delprøve af fiskebestanden).

Testbetingelser:

— Anvendt testprocedure (testtype, belastningsgrad, bestandtæthed osv.)

— Metode til fremstilling af stamopløsning og gennemstrømningshastighed

— De nominelle testkoncentrationer, ugentligt målte koncentrationer af testopløsningerne og anvendte analysemetoder, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— Fortyndingsvandets karakteristika (herunder pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor, samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof og samtlige andre udførte målinger)

— Vandkvalitet i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— Detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde samt fodermængde og fodringshyppighed såvel som analyser for relevante kontaminanter, hvis de foreligger (f.eks. PCB'er, PAH'er og organochlorpesticider).

Resultater

— Bevis for, at kontrollerne opfylder testens acceptkriterier

— Data om eventuel dødelighed ved enhver testkoncentration og kontrol

— Anvendte statistiske analyseteknikker, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker

— Data om biologiske observationer af makromorfologi, herunder sekundære kønskarakteristika, ægproduktion og VTG

— Resultater af dataanalyserne, fortrinsvis i tabelform og grafisk form

— Forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

▼M7

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF TESTRESULTATER

51. Denne del beskriver overvejelser, der bør tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne for de forskellige målte endepunkter. Resultaterne bør fortolkes med forsigtighed, når testkemikaliet tilsyneladende forårsager åbenlys toksicitet eller har indvirkning på testdyrets generelle tilstand.

52. Ved fastsættelse af testkoncentrationsintervallet skal det sikres, at den maksimalt tolererede koncentration ikke overskrides, for at give mulighed for en relevant fortolkning af dataene. Det er vigtigt at have mindst en behandling, hvor der ikke er nogen tegn på toksiske virkninger. Tegn på sygdom og tegn på toksiske virkninger bør vurderes nøje og anføres i rapporten. Det er f.eks. muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-hormonforstyrrende toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet. Fortolkningen af virkningerne kan dog styrkes af andre behandlingsniveauer, som ikke konfunderes af systemisk toksicitet.

53. Nogle få aspekter skal overvejes, hvis testresultaterne skal godkendes. Som hovedregel skal VTG-niveauerne måles hos kontrolgrupper af hanner og hunner hver for sig og være adskilt med omkring tre størrelsesordener hos tykhovedet elritse og zebrafisk og omkring en størrelsesorden hos japansk risfisk. Eksempler på værdiintervallerne i kontrol- og behandlingsgrupperne findes i valideringsrapporterne (1, 2, 3, 4). Høje VTG-værdier hos hanner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise svage østrogenagonister. Lave VTG-værdier hos hunner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise aromataseinhibitorer og østrogenagonister. Valideringsundersøgelserne dannede udgangspunkt for vejledningen.

54. Hvad angår beregningen af ægproduktionen, er den forbundet med store forskelle [variationskoefficienten (CV) kan variere fra 20 til 60 %], som påvirker assayets evne til at spore et signifikant fald i ægproduktionen på under 70 %, fordi variationskoefficienten nærmer sig 50 % eller mere. Når variationskoefficienten er begrænset til lavere værdier (ca. 20-30 %), har assayet acceptabel power (80 %) til at spore fald på 40-50 % i ægproduktionen. Testdesignet for tykhovedet elritse, som omfatter fire replikater pr. behandlingsniveau, bør tillægge frugtbarhedsendepunktet større power end ved et testdesign med kun to replikater.

55. Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør) anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence. Det anbefales at bruge kemikalier med en række virkemåder eller indvirkning på en række testendepunkter. I praksis opfordres hvert laboratorium til at opbygge sine egne historiske kontroldata for hanner og hunner og teste et positivt kontrolkemikalie for østrogenaktivitet (f.eks. østradiol-17β ved 100 ng/l eller en kendt svag agonist), som fører til øget VTG hos hanfisk, et positivt kontrolkemikalie for aromataseinhibering (f.eks. fadrozol eller prochloraz ved 300 µg/l), som fører til reduceret VTG hos hunfisk, og et positivt kontrolkemikalie for androgen aktivitet (f.eks. trenbolon-17β ved 5 µg/l), som fører til induktion af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse- og japansk risfisk-hunner. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne (1, 2, 3), for at sikre at laboratoriet har den fornødne tekniske kompetence.

56. Generelt betragtes VTG-målinger som positive, hvis der er en statistisk signifikant stigning i VTG hos hanner ($p < 0,05$) eller et statistisk signifikant fald hos hunner ($p < 0,05$), som minimum ved den højeste testede dosis, sammenlignet med kontrolgruppen, og hvis der ikke er tegn på generel toksicitet. Et positivt resultat underbygges yderligere af påvisningen af et biologisk sandsynligt forhold mellem dosis- og responskurven. Som nævnt

▼M7

tidligere har faldet i VTG muligvis ikke udelukkende endokrin oprindelse; et positivt resultat bør dog generelt fortolkes som bevis for hormonforstyrrende virkning in vivo og bør normalt give anledning til yderligere afklaring.

57. Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne kan være et krav fra tilsynsmyndighederne med henblik på at vurdere forsøgsdyrenes formeringsevne og give testresultaterne større vægt (»weight of evidence«). Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne er måske ikke nødvendig i tilfælde med et positivt resultat for VTG eller sekundære kønskarakteristika (dvs. stigning eller fald i VTG eller induktion af sekundære kønskarakteristika).

LITTERATUR

1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as »signposts,« not »traffic lights,« in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17ß-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Tillæg 1

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding

CV: variationskoefficient

ELISA: enzymkoblet immunadsorptionsteknik

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse

Belastningsgrad: fiskenes vådvægt pr. vandvolumen

MTC: maksimalt tolereret koncentration, som udgør ca. 10 % af LC_{50}

Bestandtæthed: antallet af fisk pr. vandvolumen

Testkemikalie: alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode

VTG: vitellogenin er en phospholipid-glycoprotein-precursor for æggeblomme-protein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter

▼M7

Tillæg 2

TESTBETINGELSER FOR ASSAY TIL SCREENING AF DET ENDOKRINE SYSTEM HOS FISK

1. Anbefalet art	Tykhovedet elritse (*Pimephales promelas*)	Japansk risfisk (*Oryzias latipes*)	Zebrafisk (*Danio rerio*)
2. Testtype	Gennemstrømning	Gennemstrømning	Gennemstrømning
3. Vandtemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)
5. Lysintensitet	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode (daggry/skumringsovergange er valgfri, men betragtes ikke som nødvendige)	16 t. lys, 8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke
7. Belastningsgrad	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testkammerstørrelse	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volumen testopløsning	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 6 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
11. Testorganismers alder	Jf. punkt 21	Jf. punkt 21	Jf. punkt 21
12. Voksne fisks omtrentlige vådvægt (g)	Hunner: 1,5 ± 20 % Hanner: 2,5 ± 20 %	Hunner: 0,35 ± 20 % Hanner: 0,35 ± 20 %	Hunner: 0,65 ± 20 % Hanner: 0,4 ± 20 %
13. Antal fisk pr. testbeholder	6 (2 hanner og 4 hunner)	6 (3 hanner og 3 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)
14. Antal behandlinger	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)
15. Antal beholdere pr. behandling	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Antal fisk pr. testkoncentration	16 voksne hunner og 8 hanner (4 hunner og 2 hanner i hver replikatbeholder)	12 voksne hunner og 12 hanner (3 hunner og 3 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)
17. Fodring	Levende eller frosne saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående

▼M7

18. Luftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning
19. Fortyndingsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand
20. Præeksponeringsperiode	7-14 dage anbefales	7-14 dage anbefales	7-14 dage anbefales
21. Varighed af eksponering for kemikaliet	21 dage	21 dage	21 dage
22. Biologiske endepunkter	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — sek. kønskarakteristika — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — sek. kønskarakteristika — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler
23. Testgodkendelse	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 26 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.

▼**M7**

Tillæg 3

KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

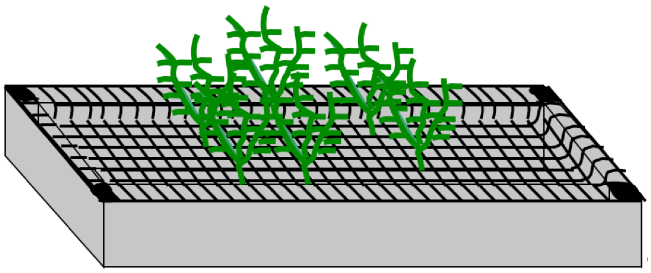
KOMPONENT	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Organisk kulstof i alt	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organiske phosphorpesticider i alt	< 50 µg/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	< 50 µg/l
Organisk chlor i alt	< 25 ng/l

▼M7

Tillæg 4A

GYDNINGSSUBSTRAT TIL ZEBRAFISK

Gydningsbakke: instrumentbakke af glas, f.eks. 22 × 15 × 5,5 cm (l × b × d), dækket med et aftageligt rustfrit metalgitter (maskebredde 2 mm). Gitteret bør dække instrumentbakkens åbning på et niveau under kanten.



Gydningssubstratet fastgøres på gitteret. Det skal fungere som en struktur, fisken kan bevæge sig ind i. Syntetiske akvarieplanter fremstillet af grønt plastmateriale er f.eks. egnede (NB: eventuel adsorption af testkemikaliet til plastmaterialet bør overvejes). Plastmaterialet bør være udvasket i et tilstrækkeligt volumen varmt vand, til at sikre at ingen kemikalier kan afgives til testvandet. Ved brug af glasmaterialer sikres det, at fiskene hverken skades eller sidder fast i forbindelse med deres kraftige aktivitet.

Afstanden mellem bakken og glaspladen bør være mindst 3 cm, for at sikre at gydningen ikke sker uden for bakken. De æg, der lægges på bakken, falder gennem gitteret og kan udtages 45-60 min. efter belysningens start. De gennemsigtige æg er ikke-klæbende og kan let tælles med tværgående lys. Når der bruges fem hunner pr. beholder, kan et antal æg på op til 20 om dagen betragtes som lavt, op til 100 som middel og over 100 som højt. Gydningsbakken fjernes, æggene indsamles, og gydningsbakken anbringes i testbeholderen igen, enten så sent som muligt om aftenen eller meget tidligt om morgenen. Bakken skal anbringes senest efter en time, da gydningssubstratet ellers kan forårsage individuel parring og gydning på et usædvanligt tidspunkt. Hvis situationen kræver, at gydningsbakken anbringes senere, skal det ske mindst ni timer efter belysningens start. På dette sene tidspunkt på dagen induceres gydning ikke længere.

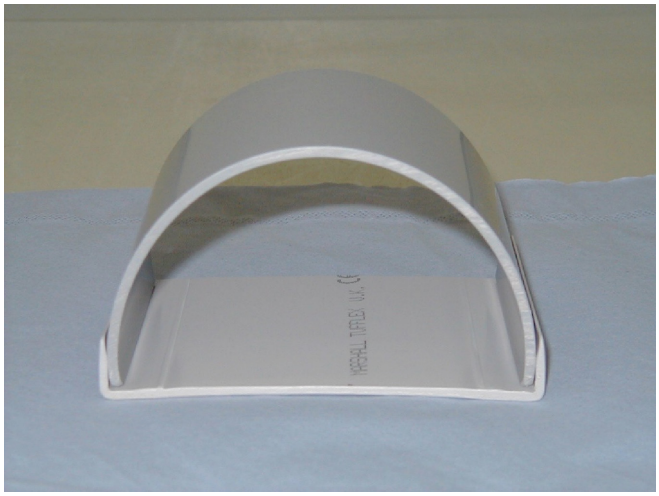
▼**M7**

Tillæg 4B

GYDNINGSSUBSTRAT TIL TYKHOVEDET ELRITSE

To eller tre kombinerede gydningsfliser og bakker af plast/keramik/glas eller rustfrit stål anbringes i hvert testkammer (f.eks. 80 mm lang grå halvcirkelformet rende på en 130 mm lang bakke med kanter) (se billede). Korrekt tørrede PVC-fliser eller keramikfliser har vist sig at være egnede til at modtage et gydningssubstrat (Thorpe et al., 2007).

Det anbefales, at fliserne slibes for at fremme adhæsion. Bakken bør desuden afskærmes for at hindre fiskenes adgang til de nedfaldne æg, medmindre det har vist sig, at æg klæber til det anvendte gydningssubstrat.



Bunden er udformet, så den indeholder eventuelle æg, der ikke klæber til flisens overflade og derfor falder ned i bunden af beholderen (eller de æg, der lægges direkte på den flade plastbund). Alt gydningssubstrat bør udvaskes i mindst 12 timer i fortyndingsvand inden brug.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Tillæg 5A

VURDERING AF SEKUNDÆRE KØNSKARAKTERISTIKA HOS TYKHOVEDET ELRITSE MED HENBLIK PÅ PÅVISNING AF VISSE HORMONFORSTYRRENDE KEMIKALIER

Oversigt

Potentielt vigtige udseenderelaterede karakteristika hos voksne fisk af arten tykhovedet elritse i test til påvisning af hormonforstyrrende stoffer omfatter kropsfarve (lys/mørk), farvemønstre (tilstedeværelse eller fravær af lodrette bånd), kropsform (hoved- og brystområde, udvidet abdomen) og specifikke sekundære kønskarakteristika (antal og størrelse af legevorter, størrelse af nakkefremspring og æglægningsorgan).

Legevorter befinder sig på hovedet (nakkefremspringet) hos formeringsaktive tykhovedet elritse-hanner og er sædvanligvis arrangeret i et bilateralt symmetrisk mønster (Jensen et al., 2001). Hunner og afkom af hankøn og hunkøn i kontrollerne udvikler ikke vorter (Jensen et al., 2001). Der kan være op til otte individuelle vorter omkring hannernes øjne og mellem næseborene. Det største antal og de største vorter befinder sig i to parallelle linjer umiddelbart under næseborene og omkring munden. Hos mange fisk er der grupper af vorter under underkæben; dem, der er tættest på munden, forekommer som regel som et enkelt par, mens sættet tættere på bugen kan bestå af op til fire vorter. Det faktiske antal vorter er sjældent højere end 30 (interval: 18-28; Jensen et al., 2001). De fremherskende vorter (for så vidt angår antal) er til stede som en enkelt, relativt rund struktur med en højde omtrent svarende til radius. De fleste formeringsaktive hanner har også, i det mindste nogle, vorter, som er så forstørrede og fremtrædende, at de ikke kan skelnes som individuelle strukturer.

Visse typer hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage abnormal forekomst af visse sekundære kønskarakteristika hos det modsatte køn; androgenreceptoragonister, såsom methyltestosteron-17α eller trenbolon-17β, kan f.eks. få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle legevorter (Smith, 1974; Ankley et al., 2001; 2003), mens østrogenreceptoragonister kan mindske antallet eller størrelsen af legevorter hos hanner (Miles-Richardson et al., 1999; Harries et al., 2000).

Nedenfor beskrives karakteriseringen af legevorter hos tykhovedet elritse baseret på fremgangsmåder brugt i U.S. Environmental Protection Agencys laboratorium i Duluth, MN. Specifikke produkter og/eller specifikt udstyr kan erstattes med tilgængelige sammenlignelige alternativer.

Observation opnås bedst med et forstørrelsesglas med lys eller et 3X-dissektionsmikroskop med lys. Observer fisken fra ryggen og med forenden fremad (hoved mod objektiv).

— Anbring fisken i en lille petriskål (f.eks. 100 mm i diameter) med forenden fremad og bugen nedad. Fokuser med søgeren for at identificere vorterne. Rul forsigtigt og langsomt fisken fra side til side for at identificere områder med vorter. Tæl og scor vorterne.

— Gentag observationen for den ventrale overflade af hovedet ved at anbringe fisken på ryggen med forenden fremad i petriskålen.

— Observationer skal være afsluttet inden for to minutter pr. fisk.

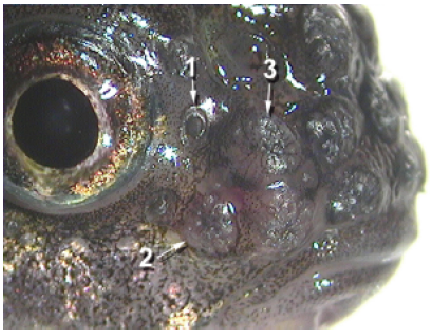
▼M7

Tælling og vurdering af vorter

Der er identificeret seks områder for vurdering af tilstedeværelsen og udviklingen af vorter hos voksen tykhovedet elritse. Der er udviklet en model for kortlægning af placering af og antal vorter (se sidst i dette tillæg). Antallet af vorter registreres, og deres størrelse kan kvantitativt vurderes som følger: 0 — fraværende, 1 — tilstedeværende, 2 — forstørret og 3 — udtalt for hver organisme (figur 1).

Score 0 — fravær af vorter. Score 1 — tilstedeværelse af vorter; identificeres som vorter med et enkelt punkt, hvis højde stort set svarer til dets radius. Score 2 — forstørret vorte; identificeres som væv, der ligner en asterisk, normalt med en stor radial base med fordybninger ud fra midten. Vorten er ofte mere forrevet, men kan undertiden være en smule afrundet. Score 3 — udtalt vorte; er normalt ret stor og afrundet med mindre defineret struktur. Vorterne løber nogle gange sammen og danner en enkelt masse i et område eller en kombination af områder (B, C og D, beskrevet nedenfor). Farve og mønster ligner score 2, men kan være forholdsvis vilkårligt. Med dette vurderingssystem opnås normalt en samlet score for vorter på < 50 hos en normal han i kontroller med 18-20 vorter (Jensen et al., 2001).

Figur 1



Det faktiske antal vorter kan hos nogle fisk være større end antallet af kasser i modellen for et givet vurderingsområde. Yderligere vurderingstal kan i givet fald markeres i, til højre for eller til venstre for kassen. Modellen skal således ikke nødvendigvis være symmetrisk. En anden teknik til kortlægning af vorter, som er parret eller hænger sammen lodret langs mundens vandrette plan, er dobbeltmarkering af to vortevurderingspunkter i en enkelt kasse.

Kortlægningsområder:

A — Vorter omkring øjnene. Kortlagt fra ryg mod bug omkring øjnenes forkant. Almindeligvis flere hos modne hanner i kontroller, ikke til stede hos hunner i kontroller, generelt parret (en ved hvert øje) eller enkeltvis hos hunner, der eksponeres for androgener.

B-Vorter mellem næsebor (porer, sensorisk kanal). Normalt i par hos hanner i kontroller ved højere udviklingsniveauer (2 — forstørret eller 3 — udtalt). Ikke til stede hos hunner i kontroller med en vis forekomst og udvikling hos hunner, der eksponeres for androgener.

C — Vorter umiddelbart foran næseborene, parallelt med munden. Generelt forstørrede eller udtalte hos hanner i kontroller. Til stede eller forstørrede hos mindre udviklede hanner eller androgenbehandlede hunner.

▼M7

D — Vorter parallelt langs mundlinjen. Vurderes generelt som udviklede hos hanner i kontroller. Fraværende hos hunner i kontroller, men til stede hos hunner, der eksponeres for androgener.

E — Vorter på underkæben, tæt på munden, normalt små og sædvanligvis i par. Varierende hos hanner i kontroller eller behandlede hanner og hos behandlede hunner.

F — Vorter ventralt i forhold til E. Normalt små og i par. Tilstedeværende hos hanner i kontroller og hos hunner, der eksponeres for androgener.

HENVISNINGER

1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Vortemodel:

ID _____

Dato _____

Score i alt _____

Numerisk score

1 – tilstedeværende

2 – forstørret

3 – udtalt

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Tillæg 5B

VURDERING AF SEKUNDÆRE KØNSKARAKTERISTIKA HOS JAPANSK RISFISK MED HENBLIK PÅ PÅVISNING AF VISSE HORMONFORSTYRRENDE KEMIKALIER

Nedenfor findes en beskrivelse af målingen af papillære strukturer ([1]), som er de sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk (*Oryzias latipes*).

1) Efter udskæring af leveren (tillæg 6) anbringes kadaveret i et konisk rør, som indeholder ca. 10 ml 10 % neutralt bufret formalin (opad: hoved, nedad: hale). Hvis kønskirtlen er fikseret i andet end 10 % neutralt bufret formalin, foretages et tværsnit på tværs af kadaveret mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel, idet det omhyggeligt undgås at skade kønsåbningen og selve kønskirtlen (figur 3). Anbring kraniesiden af fiskekroppen i fikseringsopløsningen for at præservere kønskirtlen og halesiden af fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin som beskrevet ovenfor.

2) Når fiskekroppen er anbragt i 10 % neutralt bufret formalin, gribes den forreste del af gatfinnen med en pincet og holdes bøjet i omkring 30 sekunder for at holde gatfinnen åben. Når gatfinnen gribes med pincetten, tager man forsigtigt fat i nogle få finnestråler i den forreste del for ikke at ridse de papillære strukturer.

3) Når gatfinnen har været holdt åben i omkring 30 sekunder, opbevares fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin ved stuetemperatur indtil måling af de papillære strukturer (måling bør foretages efter fiksering i mindst 24 timer).

Måling

1) Når fiskekroppen har været fikseret i 10 % neutralt bufret formalin i mindst 24 timer, opsamles fiskekadaveret fra det koniske rør, og formalinet tørres af med filterpapir (eller en papirserviet).

2) Anbring fisken med abdomen opad. Afskær derefter forsigtigt gatfinnen med en lille dissektionssaks (det foretrækkes, at en smule pterygiophor afskæres sammen med gatfinnen).

3) Grib den forreste del af den afskårne gatfinne med en pincet, og anbring den på en glasplade med flere dråber vand. Dæk derefter gatfinnen med et dækglas. Det er vigtigt ikke at ridse de papillære strukturer, når man griber gatfinnen med pincetten.

4) Tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer ved hjælp af tælleren i et biologisk mikroskop (opretstående mikroskop eller omvendt mikroskop). De papillære strukturer genkendes, når en lille formation af strukturer er synlig på bagkanten af ledskiven. Registrer antallet af ledskiver med papillære strukturer i hver finnestråle på arbejdsarket (f.eks. første finnestråle: 0, anden

([1]) Papillære strukturer ses normalt kun hos voksne hanner og observeres på finnestråler fra den anden til den syvende eller ottende talt fra den bageste ende af gatfinnen (figur 1 og 2). Strukturerne forekommer dog sjældent på den første finnestråle fra den bageste ende af gatfinnen. Denne standardprocedure omfatter måling af strukturer på den første finnestråle (i denne standardprocedure henviser finnestrålenummeret til rækkefølgen fra den bageste ende af gatfinnen).

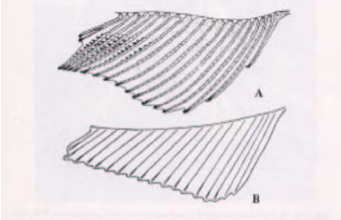
▼M7

finnestråle: 10, tredje finnestråle: 12 osv.), og indtast summen i Excel-arket for hver fisk. Tag om nødvendigt et billede af gatfinnen, og tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer på billedet.

5) Efter målingen anbringes gatfinnen i det koniske rør, der er beskrevet i (1), og opbevares.

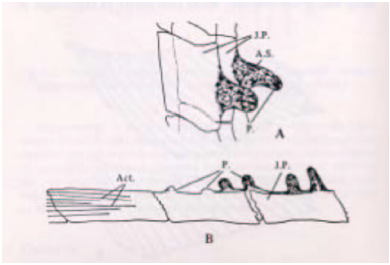
Figur 1.

Diagram, der viser kønsforskelle i gatfinnens form og størrelse. A, han; B, hun. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



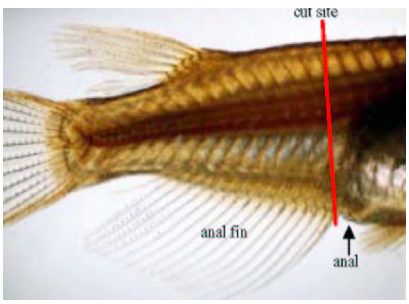
Figur 2.

A — Strukturer på gatfinnes ledskiver. J.P. (joint plate): ledskive; A.S. (axial space): aksial afstand; P. (process): struktur. B — Finnestråles distale ekstremitet. Actinotrichia (Act.) er på spidsen. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Figur 3.

Billede af fiskekrop, der viser det sted, hvor der skal skæres, når kønskirtlen er fikseret i en anden fikseringsopløsning end 10 % neutralt bufret formalin. I givet fald afskæres den resterende del af kroppen mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel (rød streg). Hovedsiden af fiskens krop anbringes i fikseringsopløsningen til kønskirtlen, og halesiden af fiskekroppen anbringes i 10 % neutralt bufret formalin.



▼M7

Tillæg 6

ANBEFALEDE PROCEDURER FOR PRØVEUDTAGNING TIL VITELLOGENININANALYSE

Det sikres, at der ikke forekommer krydskontamination mellem VTG-prøver fra hanner og hunner.

Fremgangsmåde 1A: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Efter bedøvelse afskæres haleroden delvist med en skalpel, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Når blodet er indsamlet, isoleres plasma hurtigt ved centrifugering i 3 minutter ved 15 000 *g* (eller alternativt i 10 minutter ved 15 000 g ved 4 °C). Om ønsket kan hæmatokritprocenten bestemmes efter centrifugering. Plasmadelen fjernes derefter fra mikrohæmatokritrøret og opbevares i et centrifugeglas med 0,13 enheder aprotinin (en proteaseinhibitor) ved – 80 °C, indtil VTG kan bestemmes. Afhængigt af størrelsen af den tykhovedede elritse (som er kønsbestemt) kan der generelt indsamles et plasmavolumen på 5-60 mikroliter pr. fisk (Jensen et al., 2001).

Fremgangsmåde 1B: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra hjertet

Alternativt kan blod indsamles ved hjertepunktur med en hepariniseret kanyle (1 000 enheder heparin pr. ml). Blodet overføres til Eppendorf-rør (holdt på is) og centrifugeres (5 min., 7 000 *g*, stuetemperatur). Plasmaet overføres til rene Eppendorf-rør (i alikvoter, hvis plasmavolumenet tillader det) og nedfryses omgående ved – 80 °C, indtil det skal analyseres (Panter et al., 1998).

Fremgangsmåde 2A: Japansk risfisk, udskæring af leveren hos japansk risfisk

Fjernelse af testfisken fra testkammeret

1) Testfisk fjernes fra testkammeret med et lille fiskenet. Undgå at tabe testfisken ned i andre testkamre.

2) Testfisk skal principielt fjernes i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol. Derudover bør alle hanner fjernes fra et testkammer, før de resterende hunner fjernes.

3) Hver testfisks køn identificeres ud fra ydre sekundære kønskarakteristika (f.eks. gatfinnens form).

4) Anbring testfisken i en transportbeholder, og bær den til arbejdsstationen med henblik på udskæring af leveren. Kontroller, at etiketterne på testkammeret og transportbeholderen er korrekte, og at antallet af fisk, der er blevet fjernet fra testkammeret, og antallet af fisk, som er tilbage i testkammeret, er som forventet.

5) Hvis kønnet ikke kan identificeres ud fra fiskens ydre udseende, fjernes alle fisk fra testkammeret. I givet fald identificeres kønnet ved observation af kønskirtlen eller sekundære kønskarakteristika under stereoskopisk mikroskop.

Udskæring af leveren

1) Overfør testfisken fra transportbeholderen til opløsningen med anæstetikum ved hjælp af det lille fiskenet.

▼M7

2) Når testfisken er bedøvet, overføres den til filterpapir (eller en papirserviet) med en almindelig pincet. Når testfisken gribes, bruges pincetten til at tage fat på hver side af hovedet, så halen ikke går i stykker.

3) Tør vandet af testfiskens overflade med filterpapiret (eller papirservietten).

4) Anbring fisken med abdomen opad. Foretag derefter et lille tværsnit halvvejs mellem den ventrale nakkeregion og den midterste del af bugen med en dissektionssaks.

5) Indfør dissektionssaksen i det lille snit, og foretag et snit i abdomen fra et punkt bag gælleklappen til den forreste del af anus langs abdomens midterlinje. Dissektionssaksen må ikke føres for dybt ind, da man risikerer at skade leveren og kønskirtlen.

6) Foretag følgende operationer under et stereoskopisk mikroskop.

7) Anbring testfisken med abdomen opad på papirservietten (petriskål af glas eller objektglas er også en mulighed).

8) Udvid bughulens vægge med en præcisionspincet, og blotlæg de indre organer. Det er også acceptabelt om nødvendigt at blotlægge de indre organer ved at fjerne den ene side af bughulevæggen.

9) Blotlæg den forbundne del af leveren og galdeblæren med en anden præcisionspincet. Grib galdegangen, og afskær galdeblæren. Sørg for ikke at ødelægge galdeblæren.

10) Grib spiserøret, og afskær mave-tarm-kanalen fra leveren på samme måde. Sørg for, at indholdet i mave-tarm-kanalen ikke flyder ud. Afskær den bageste del af mave-tarm-kanalen fra anus, og fjern kanalen fra bughulen.

11) Fjern fedtmassen og andet væv fra leverens periferi. Sørg for ikke at ridse leveren.

12) Grib området ved den hepatiske portal med en præcisionspincet, og fjern leveren fra bughulen.

13) Anbring leveren på objektglasset. Eventuelt yderligere fedt og udefrakommende væv (f.eks. laget omkring bugen) fjernes fra leverens overflade.

14) Mål leverens vægt med et 1,5 ml mikrorør som tara med en elektronisk analysevægt. Registrer værdien på arbejdsarket (aflæsning: 0,1 mg). Bekræft identifikationsinformationen på mikrorørets etiket.

15) Luk låget på det mikrorør, der indeholder leveren. Opbevar det på et kølestativ (eller isstativ).

16) Efter udskæringen af en lever rengøres dissektionsinstrumenterne eller erstattes med rene instrumenter.

▼M7

17) Fjern leverne fra alle fiskene i transportbeholderen som beskrevet ovenfor.

18) Når leverne er skåret ud af alle fisk i transportbeholderen (dvs. alle hanner eller hunner i et testkammer), anbringes alle leverprøver i et reagensglasstativ med en identifikationsetiket og opbevares i en fryser. Når leverne gives til forbehandling kort efter udskæringen, bæres prøverne til den næste arbejdsstation på et kølestativ (eller isstativ).

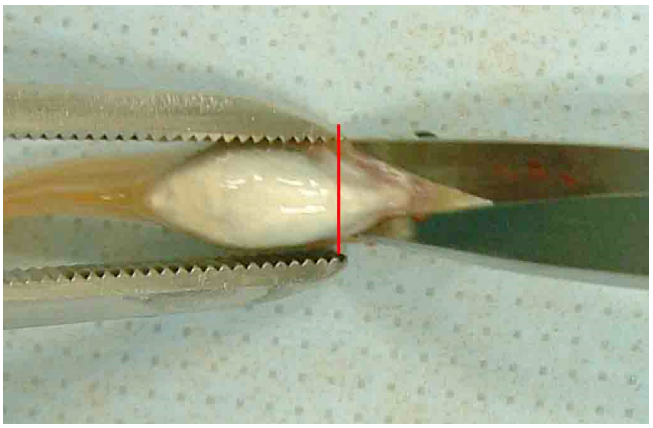
Efter udskæring af leveren kan fiskekadaveret anvendes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne og måling af sekundære kønskarakteristika.

Prøveemne

Opbevar leverprøver udtaget fra testfisken ved ≤ – 70 °C, hvis de ikke bruges til forbehandling kort efter udskæringen.

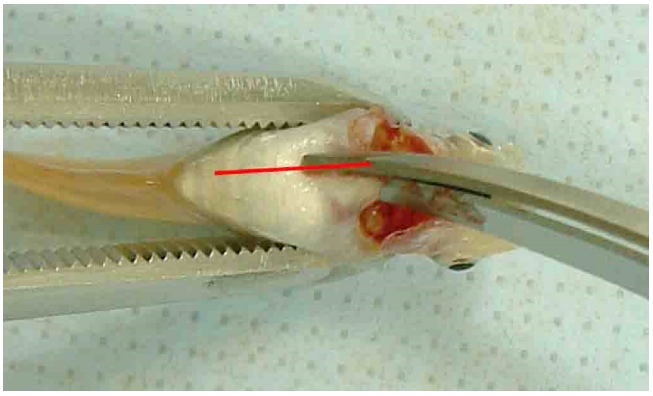
Figur 1

Der foretages et snit lige foran brystfinnerne med en saks.



Figur 2

Der foretages et snit langs midterlinjen af abdomen til et punkt ca. 2 mm foran anus.



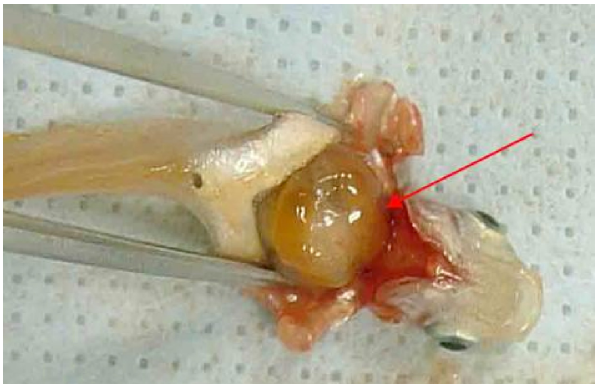
▼M7

Figur 3

Bugvæggene spredes med pincet for at blotlægge leveren og andre indre organer.

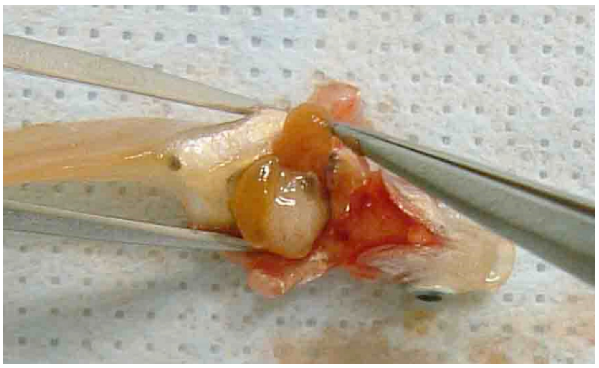
(Alternativt hæftes bugvæggene op lateralt).

Pilen angiver leveren.



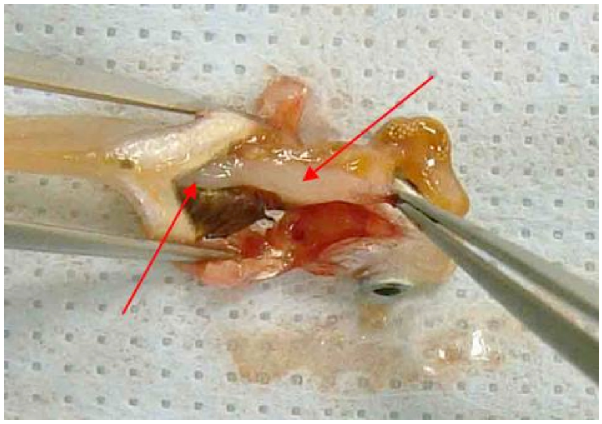
Figur 4

Leveren dissekeres stumpt og udtages med pincet.



Figur 5

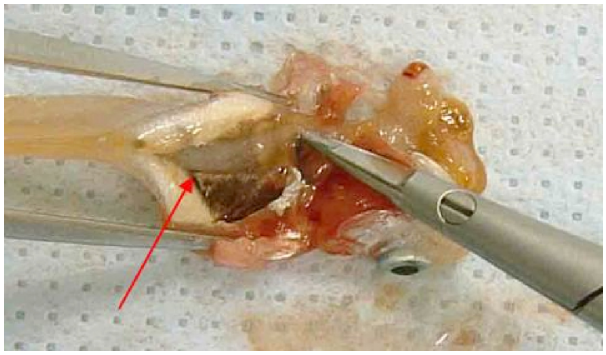
Indvoldene tages forsigtigt ud med pincet.



▼M7

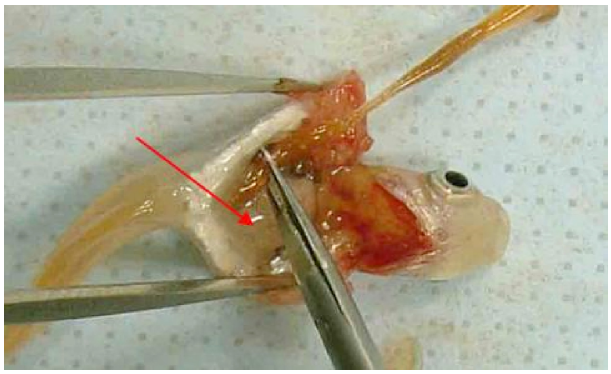
Figur 6

Begge ender af indvoldene og eventuelle tilknyttede mesenteriske strukturer afskæres med saks.



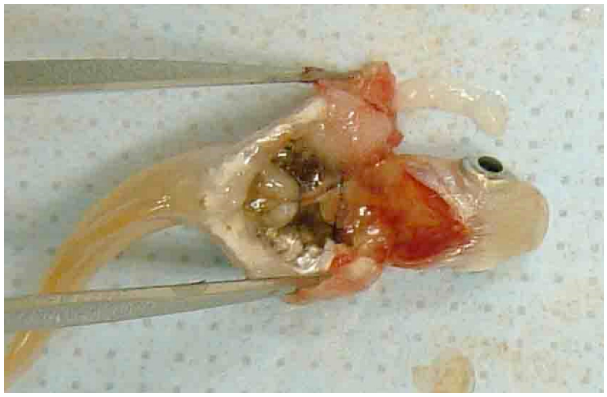
Figur 7 (hun)

Proceduren er identisk for hundyr.



Figur 8

Den afsluttede procedure.



▼M7

Fremgangsmåde 2B: Japansk risfisk (*Oryzias latipes*), forbehandling af lever med henblik på vitellogeninanalyse

Tag kolben med homogenatbuffer fra ELISA-kittet, og afkøl den med knust is (opløsningens temperatur: ≤ 4 °C). Hvis der bruges homogenatbuffer fra EnBio ELISA-systemet, optøs opløsningen ved stuetemperatur, og kolben afkøles med knust is.

Beregn volumenet af homogenatbuffer til leveren på grundlag af dens vægt (tilsæt 50 µl homogenatbuffer pr. mg lever). Hvis leveren f.eks. vejer 4,5 mg, skal der bruges 225 µl homogenatbuffer til leveren. Udarbejd en liste over homogenatbuffervolumen for alle levere.

Klargøring af leveren til forbehandling

1) Tag 1,5 ml-mikrorøret, der indeholder leveren, ud af fryseren umiddelbart inden forbehandlingen.

2) Forbehandling af leveren fra hanner bør foretages før forbehandlingen af leveren fra hunner for at forhindre vitellogeninkontaminering. Forbehandlingen til testgrupperne bør desuden foregå i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol.

3) Antallet af 1,5 ml-mikrorør, som indeholder leverprøver taget fra fryseren, må på et givet tidspunkt ikke overstige det antal, der kan centrifugeres på det pågældende tidspunkt.

4) Arranger 1,5 ml-mikrorørene med leverprøverne i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet (det er ikke nødvendigt at optø leveren).

Udførelse af forbehandlingen

1) Tilsætning af homogenatbufferen

   Se på listen, hvilket homogenatbuffervolumen der skal bruges til en specifik leverprøve, og juster mikropipetten (volumeninterval: 100-1 000 µl) til det rette volumen. Sæt en ren spids på mikropipetten.

   Tag homogenatbufferen fra reagensglasset, og tilsæt bufferen til 1,5 ml-mikrorøret med leveren.

   Tilsæt homogenatbuffer til alle 1,5 ml-mikrorør med lever i henhold til ovennævnte procedure. Det er ikke nødvendigt at sætte en ny spids på mikropipetten. Hvis spidsen er kontamineret eller mistænkes for at være det, skal den dog udskiftes.

2) Homogenisering af leveren

   — Sæt en ny støder på homogenisatoren med henblik på homogenisering.

   — Indfør støderen i 1,5 ml-mikrorøret. Hold homogenisatoren, således at leveren presses mellem støderens overflade og mikrorørets indervæg.

   — Kør homogenisatoren i 10-20 sekunder. Afkøl mikrorøret med knust is under operationen.

▼M7

— Løft støderen op af mikrorøret, og hold den stille i omkring ti sekunder. Undersøg derefter suspensionens tilstand visuelt.

— Hvis stykker af lever observeres i suspensionen, gentages trin (3) og (4) for at fremstille et tilfredsstillende leverhomogenat.

— Afkøl det opslæmmede leverhomogenat på isstativet indtil centrifugering.

— Udskift støderen for hvert homogenat.

— Homogeniser alle levere med homogenatbuffer i henhold til ovennævnte procedure.

3) Centrifugering af det opslæmmede leverhomogenat

— Kontroller, at temperaturen i det afkølede centrifugekammer er på ≤ 5 °C.

— Indsæt 1,5 ml-mikrorørene med det opslæmmede leverhomogenat i den afkølede centrifuge (juster om nødvendigt balancen).

— Centrifuger det opslæmmede leverhomogenat ved 13 000 g i 10 min. ved ≤ 5 °C. Hvis supernatanterne er tilstrækkeligt separeret, kan centrifugalkraften og tiden dog justeres efter behov.

— Efter centrifugeringen kontrolleres det, at supernatanterne er tilstrækkeligt separeret (overflade: fedtstoffer, mellemlag: supernatant, nederste lag: levervæv). Hvis separationen ikke er tilstrækkelig, centrifugeres suspensionen igen under samme betingelser.

— Fjern alle prøver fra den afkølede centrifuge, og arranger dem i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet. Sørg for ikke at resuspendere de enkelte separerede lag efter centrifugeringen.

4) Indsamling af supernatanten

— Anbring fire 0,5 ml-mikrorør til opbevaring af supernatanten i reagensglasstativet.

— Indsaml 30 µl af hver supernatant (separeret som det mellemliggende lag) med mikropipetten, og fyld det i et 0,5 ml-mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.

— Indsaml supernatanten, og fyld den i to andre 0,5 ml-mikrorør på samme måde som beskrevet ovenfor.

— Indsaml resten af supernatanten med mikropipetten (om muligt: ≥ 100 µl). Fyld derefter supernatanten i det sidste mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.

— Luk mikrorørets låg, og angiv supernatantens volumen på etiketten. Afkøl derefter straks mikrorørene på isstativet.

— Sæt en ny spids på mikropipetten for hver supernatant. Hvis en stor mængde fedtstoffer sætter sig fast i spidsen, skal den straks udskiftes, for at forhindre at leverekstraktet kontamineres med fedtstoffet.

▼M7

— Fordel hele den centrifugerede supernatant i fire 0,5 ml-mikrorør i henhold til ovennævnte procedure.

— Når supernatanten er fordelt i mikrorørene, anbringes de alle i reagensglasstativet med identifikationsetiketten og nedfryses straks. Hvis VTG-koncentrationerne måles umiddelbart efter forbehandlingen, holdes et af mikrorørene (som indeholder 30 µl supernatant) afkølet i reagensglasstativet og overføres til den arbejdsstation, hvor ELISA-assayet udføres. I givet fald anbringes de resterende mikrorør i reagensglasstativerne og fryses i fryseren.

— Når supernatanten er indsamlet, kasseres remanensen med det samme.

Opbevaring af prøven

Opbevar mikrorørene med supernatanten fra leverhomogenatet ved ≤ – 70 °C, indtil de skal bruges til ELISA-assayet.

Fremgangsmåde 3A: Zebrafisk, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Umiddelbart efter bedøvelse afskæres haleroden på tværs, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et heparinieret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Blodvolumenerne er 5-15 mikroliter afhængigt af fiskens størrelse. Et tilsvarende volumen aprotininbuffer (6 mikrogram/ml i PBS) tilsættes til mikrokapillærrøret, og plasma separeres fra blodet ved centrifugering (fem minutter ved 600 *g*). Plasma indsamles i testrørene og opbevares ved – 20 °C, indtil de skal analyseres for VTG eller andre proteiner af interesse.

Fremgangsmåde 3B: Zebrafisk, indsamling af blod ved hjertepunktur

For at undgå koagulering af blod og nedbrydning af protein indsamles prøverne i phosphatbufret saltvand (PBS), som indeholder heparin (1 000 enheder/ml) og proteaseinhibitoren aprotinin (2 TIU/ml). Det anbefales at bruge heparin, ammonium-salt og lyofiliseret aprotinin som bestanddele i bufferen. Det anbefales at bruge en kanyle (1 ml) med en fast tynd nål (f.eks. Braun Omnikan-F) til blodprøveudtagning. Kanylen bør på forhånd være påfyldt buffer (ca. 100 mikroliter) for helt at eluere de små volumener blod fra hver fisk. Blodprøverne udtages ved hjertepunktur. Først bedøves fisken med MS-222 (100 mg/l). Ved det rette anæstesiniveau kan brugeren identificere zebrafiskens hjerteslag. Under hjertepunktur holdes kanylens stempel under svagt tryk. Der kan indsamles 20-40 mikroliter blod. Efter hjertepunktur fyldes blod/buffer-blandingen i reagensglasset. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering (20 min.; 5 000 *g*) og opbevares ved – 80 °C, indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde 3C: Standardprocedure: Zebrafisk, homogenisering af hoved og hale

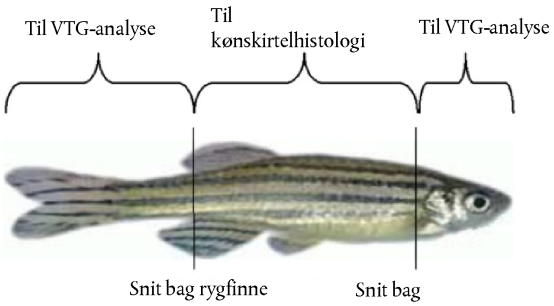
1. Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.

2. Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med figur 1.

Bemærk: *Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »vitellogeninforurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikke-inducerede hanner.*

▼**M7**

Figur 1



3. Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.

4. Når delene er vejet, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og nedfryses ved – 80 °C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is og resulterer i en homogen masse). Bemærk: Rørene *nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropssektion, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.*

5. Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold **homogeniseringsbuffer** ([1]) på 4 gange vævsvægten. Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. Vigtigt: Der *bruges nye pistiller til hver fisk.*

6. Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved **4 °C** ved 50 000 *g* i 30 min.

7. Anvend en pipette til at fordele portioner a 20 µl supernatant i **mindst to** rør ved at dyppe spidsen af pipetten ned under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.

8. Rørene opbevares ved – 80 °C indtil brug.

([1]) Homogeniseringsbuffer:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaseinhibitorblanding.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), f.eks. fra Bie & Berntsen, Danmark.
— Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv), produktnummer P 8340.
BEMÆRK: Homogeniseringsbufferen skal anvendes samme dag, som den er fremstillet. Anbringes på is under brug.

▼M7

Tillæg 7

VITELLOGENINSPIKEDE PRØVER OG REFERENCESTANDARD FOR ASSAYET

På hver dag, hvor der gennemføres VTG-assay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet. Det VTG, der bruges til at fremstille referencestandarden for assayet, vil være fra et andet parti end det, der bruges til at fremstille kalibrereringsstandarder for det udførte assay.

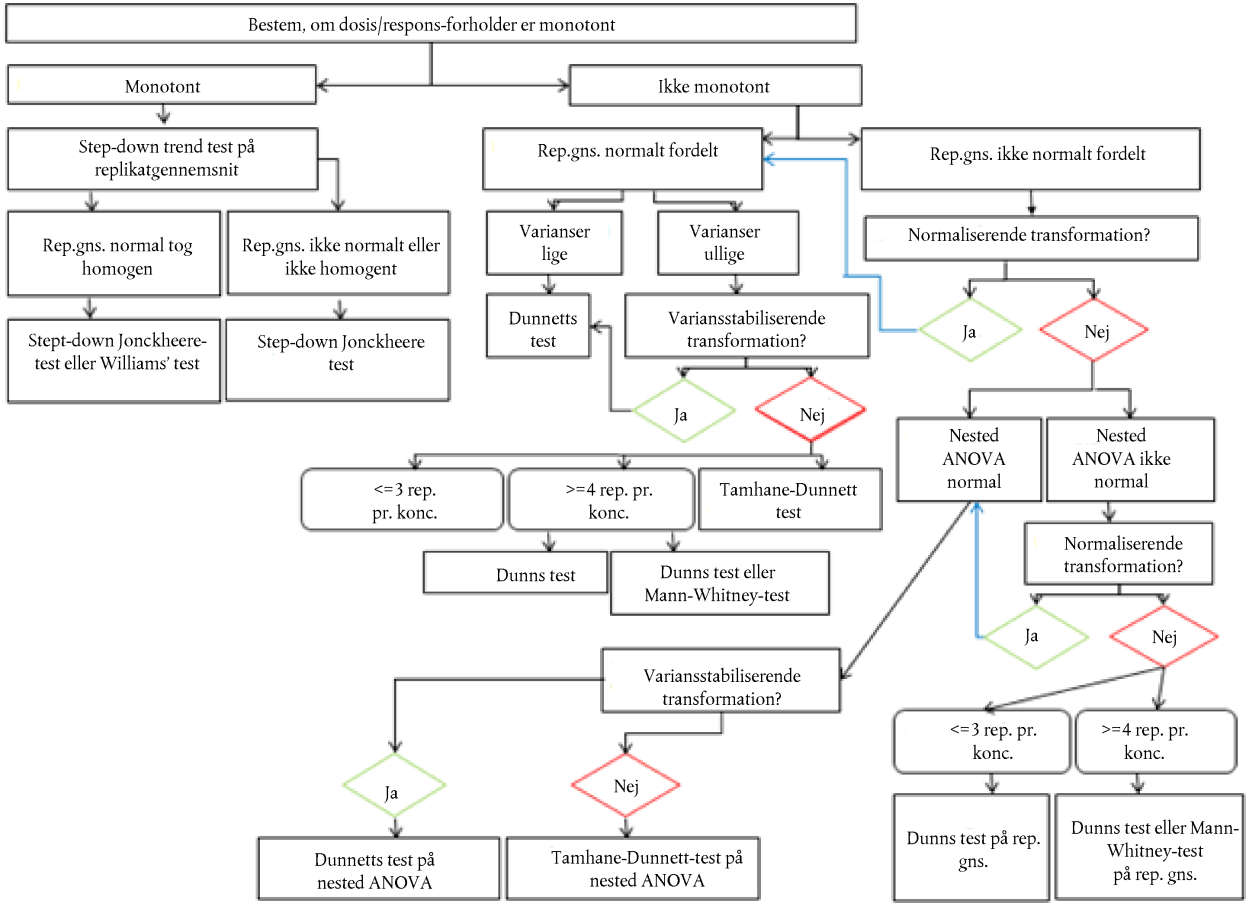
Den spikede prøve fremstilles ved at tilsætte en kendt mængde af standarden for assayet til en prøve af plasma fra hanner i kontrollerne. Prøven spikes til en VTG-koncentration på 10-100 gange den forventede vitellogeninkoncentration for hanner i kontrollerne. Den spikede prøve af plasma fra hanner i kontrollerne kan være fra en enkelt fisk eller en kombination af flere fisk.

En underprøve af ikke-spiket plasma fra hanner i kontrollerne analyseres i mindst to duplikate brønde. Den spikede prøve analyseres også i mindst to duplikate brønde. Den gennemsnitlige mængde vitellogenin i de to ikke-spikede prøver af plasma fra hanner i kontrollerne lægges til den beregnede mængde VTG, der tilsættes til prøverne for at bestemme en forventet koncentration. Forholdet mellem denne forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert sæt assay gennemført på den pågældende dag.

▼M7

Tillæg 8

BESLUTNINGSFLOWDIAGRAM TIL STATISTISK ANALYSE



▼M7

C.49. TEST AF AKUT TOKSICITET FOR FISKEEMBRYONER (FET)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) (TG) 236 (2013). Den beskriver en test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET) hos zebrafisk (*Danio rerio*). Formålet med denne test er at bestemme kemikaliers akutte toksicitet for fisk i fosterstadiet. FET-testen er baseret på undersøgelser og valideringsaktiviteter udført på zebrafisk (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testen har med stor succes været anvendt på en lang række kemikalier, der udviser forskellige virkemåder, opløseligheder, volatilitet og hydrofobiciteter (revideret i 15 og 16).

2. Definitioner anvendt i denne forsøgsmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Nybefrugtede zebrafiskeæg eksponeres for testkemikaliet i en periode på 96 timer. Hver 24. time registreres op til fire apikale observationer som indikatorer for dødelighed (6): i) koagulering af befrugtede æg, ii) mangel på dannelse af somitter, iii) manglende løsnen af halen fra blommesækken og iv) manglende hjerteslag. Efter eksponeringsperioden bestemmes akut toksicitet på grundlag af et positivt resultat i en hvilken som helst af de fire registrerede apikale observationer, og LC_{50} beregnes.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

4. Nyttige oplysninger om stofspecifikke egenskaber omfatter strukturformlen, molekylvægt, renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a and K_{ow}, vandopløselighed og damptryk samt resultaterne af en test for let bionedbrydelighed (TM C.4 (17) eller TM C.29 (18)). Opløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forekomme et tab som følge af fordampning af testkemikaliet. En pålidelig analyse til kvantificering af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og publiceret »accuracy« og nederste målegrænse bør foreligge.

5. Hvis forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding, bør der så vidt muligt foreligge oplysninger om dens sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og deres stofspecifikke egenskaber (jf. punkt 4). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.

6. For stoffer, der kan aktiveres via metabolisme, er der dokumentation for, at zebrafisks embryoner har biotransformationskapacitet (19) (20) (21) (22). Den metaboliske kapacitet hos fisk i fosterstadiet er imidlertid ikke altid den samme som hos unge eller voksne fisk. Eksempelvis blev protoxicanten allylalkohol ikke påvist som giftig (9) i FET. Hvis der derfor er tegn på, at metabolitter eller andre relevante omdannelsesprodukter kan være mere toksiske end moderforbindelsen, anbefales det også at udføre testen med disse metabolitter/omdannelsesprodukter og anvende disse resultater ved fastlæggelsen af testkemikaliets toksicitet eller alternativt foretage en ny test, som tager yderligere højde for metabolisme.

7. For stoffer med en molekylvægt på ≥ 3 kDa, en meget omfangsrig molekylestruktur og stoffer, der forårsager forsinket klækning, som kan forhindre eller reducere eksponeringen efter klækning, ventes embryoner ikke at være følsomme på grund af stoffets begrænsede biotilgængelighed, og andre toksicitetstest kan være mere hensigtsmæssige.

▼M7

TESTENS GYLDIGHED

8. Testresultaternes validitet forudsætter følgende:

a) Den samlede befrugtning af alle indsamlede æg bør være ≥ 70 % i det undersøgte parti.

b) Vandtemperaturen bør holdes på 26 °C ± 1 °C i testbeholdere på ethvert tidspunkt under testen.

c) Den samlede overlevelse af embryoner i den negative kontrol (fortyndingsvand) og, hvor det er relevant, i opløsningsmiddelkontrollen bør være ≥ 90 % indtil slutningen af de 96 timers eksponering.

d) Eksponering for den positive kontrol (f.eks. 4,0 mg/l 3,4-dichloranilin for zebrafisk) bør resultere i en minimumsdødelighed på 30 % efter 96 timers eksponering.

e) Klækningshastigheden i den negative kontrol (og evt. opløsningsmiddelkontrollen) bør være ≥ 80 % efter 96 timers eksponering.

f) Efter 96 timers eksponering bør koncentrationen af opløst ilt i den negative kontrol og den højeste testkoncentration være ≥ 80 % mætning.

BESKRIVELSE AF METODEN

9. En oversigt over anbefalede vedligeholdelses- og testbetingelser findes i tillæg 2.

Apparatur

10. Der er behov for følgende udstyr:

a) fisketanke fremstillet af et kemisk inert materiale (f.eks. glas) og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad (jf. »Vedligeholdelse af yngelfisk«, punkt 14)

b) inverteret mikroskop og/eller kikkert med en forstørrelseskapacitet på mindst 80 fold. Hvis det lokale, der benyttes til registrering af observationer, ikke kan indstilles til 26 ± 1 °C, er der behov for et temperaturstyret flytbart bord eller andre metoder til at opretholde temperaturen.

c) testkamre, f.eks. plader med 24 brønde af standardtypen med en dybde på ca. 20 mm (jf. »Testkamre«, punkt 11)

d) f.eks. selvklæbende folie til dækning af pladerne med 24 brønde

e) inkubator eller luftkonditionerede rum med temperaturstyring, der gør det muligt at opretholde 26 ± 1 °C i brønde (eller testkamre)

f) pH-meter

g) oxygenmeter

h) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og ledningsevne

i) gydefælde: instrumentbakker af glas, rustfrit stål eller andet inert materiale, trådnet (gitterstørrelse 2 ± 0,5 mm) af rustfrit stål eller andet inert materiale til at beskytte æggene, når de er lagt; gydningssubstrat (f.eks. planteefterligninger af inert materiale) (TM C. 48, tillæg 4a (23))

j) pipetter med brede åbninger til at indsamle æg

▼M7

k) glaskar til at klargøre forskellige testkoncentrationer og fortyndingsvand (bægerglas, målekolber, målecylindere og målepipetter) eller til at indsamle zebrafiskeæg (f.eks. bægerglas, krystallisationsskåle)

l) Hvis der anvendes alternative eksponeringssystemer, som f.eks. gennemstrømning (24) eller passiv dosering (25), til udførelsen af testen, er der behov for passende faciliteter og udstyr.

Testkamre

11. Der bør anvendes testkamre af glas eller polystyren (f.eks. plader med 24 brønde med 2,5-5 ml påfyldningskapacitet pr. brønd). Ved mistanke om adsorption til polystyren (f.eks. for ikke-polære, plane stoffer med høj K_{ow}) bør der anvendes inert materiale (glas) til at begrænse tabene på grund af adsorption (26). Testkamrene bør placeres randomiseret i inkubatoren.

Vand- og testbetingelser

12. Det anbefales også at fortynde vedligeholdelsesvandet for at opnå de typiske hårdhedsniveauer for en bred vifte af overfladevand. Vand til fortynding bør fremstilles på baggrund af kunstigt fremstillet ferskvand (27). Den dannede hårdhed bør svare til 100-300 mg/l $CaCO_3$ for at undgå for stor udfældning af calciumcarbonat. Andet velkarakteriseret overflade- eller brøndvand kan anvendes. Kunstigt fremstillet ferskvand kan tilpasses vedligeholdelsesvand med lav hårdhed ved fortynding med deioniseret vand op til et forhold på 1:5 og en hårdhed på mindst 30-35 mg/l $CaCO_3$. Vandet beluftes til iltmætning før tilsætning af testkemikaliet. Temperaturen bør holdes på 26 ± 1 °C i brøndene under hele testen. PH-værdien bør være mellem 6,5 og 8,5 og må ikke variere inden for dette område med mere end 1,5 enheder i løbet af testen. Hvis pH-værdien ikke forventes at holde sig inden for dette interval, bør den tilpasses inden testen. PH-justeringen bør foretages på en sådan måde, at stamopløsningens koncentration ikke ændres nævneværdigt, og så der ikke sker nogen kemisk reaktion eller udfældning af testkemikaliet. Det anbefales at bruge hydrogenchlorid (HCl) og natriumhydroxid (NaOH) til justering af pH i opløsninger, der indeholder testkemikaliet.

Testopløsninger

13. Testopløsninger med den valgte koncentration kan f.eks. fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Hvis testkemikaliet er vanskeligt at opløse i vand, bør de procedurer, der er beskrevet i OECD's vejledning nr. 23 om håndtering af vanskelige stoffer og blandinger følges (28). Anvendelse af opløsningsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, bør dens slutkoncentration ikke være højere end 100 µl/l og bør være den samme i alle testbeholdere. Når der anvendes et opløsningsmiddel, er der behov for yderligere opløsningsmiddelkontrol.

Vedligeholdelse af yngelfisk

14. En avlsdyrbestand bestående af ueksponerede, vilde zebrafisk med veldokumenteret befrugtning af æg anvendes til produktion af æg. Fiskene bør være fri for makroskopisk synlige symptomer på infektion og sygdomme og bør ikke have undergået nogen form for farmaceutisk (akut eller profylaktisk) behandling i to måneder før gydning. Avlsfisk holdes i akvarier med et anbefalet rumindhold på 1 liter vand pr. fisk og en fast lysperiode på 12-16 timer (29) (30) (31) (32) (33). Optimal filtrering bør tilpasses, og overskydende filtrering, der medfører kraftige forstyrrelse af vandet, bør undgås.

▼M7

Vedrørende fodring, se tillæg 2. Overskudsfodring bør undgås, og vandets kvalitet og akvariets renhed bør overvåges regelmæssigt og om nødvendigt nulstilles til den oprindelige tilstand.

Præstationstest

15. Som referencekemikalie bør 3,4-dichloranilin (som anvendes i valideringsundersøgelser (1) (2)) testes i en fuld koncentration/respons til kontrol af følsomheden af den anvendte fiskestamme, fortrinsvis to gange om året. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte referencekemikaliet. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende udførelsen af assayet, inden det påbegynder fremsendelse af data til forskriftsmæssige formål.

Ægproduktion

16. Zebrafiskeæg kan produceres i gydegrupper (i individuelle gydetanke) eller via massegydning (i vedligeholdelsestankene). Med hensyn til gydegrupper placeres hanner og hunner (f.eks. i forholdet 2:1) i en avlsgruppe i gydetanke et par timer før mørkets frembrud på dagen før testen. Da gydegrupper af zebrafisk undertiden ikke gyder, anbefales det parallelt dermed at anvende mindst tre gydetanke. For at undgå genetiske skævheder indsamles der æg fra mindst tre blandede og tilfældigt udvalgte avlsgrupper.

17. Til indsamling af æg anbringes gydefælder i gydetankene eller vedligeholdelsestankene inden mørkets frembrud på dagen før testen eller før lysets frembrud på selve testdagen. For at forhindre voksne zebrafisks rov af æg er gydefælderne dækket af inert trådnet af passende maskestørrelse (ca. 2 ±0,5 mm). Hvis det anses for nødvendigt, kan kunstige planter fremstillet af et inert materiale (f.eks., plast eller glas) fastgøres til nettet som gydestimulus (3) (4) (5) (23) (35). Der bør anvendes forvitret plastmateriale som ikke lækker (f.eks. phthalater). Parring, gydning og befrugtning sker inden for 30 min. efter lysets frembrud, og gydefælderne med de indsamlede æg kan forsigtigt fjernes. Det anbefales at skylle æggene med kunstigt fremstillet ferskvand efter indsamling fra gydefælderne.

Differentiering af æg

18. Ved 26 °C deler befrugtede æg sig første gang efter ca. 15 min., og de efterfølgende synkrone delinger danner 4, 8, 16 og 32 celleblastomerer (jf. tillæg 3) (35). I disse faser kan de befrugtede æg let identificeres med udviklingen af et blastula.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

19. Tyve embryoner pr. koncentration (et embryon pr. brønd) eksponeres for testkemikaliet. Eksponeringen bør foregå på en sådan måde, at der fastholdes ± 20 % af den nominelle kemikaliekoncentration under hele testen. Hvis dette ikke er muligt i et statisk system, bør der anvendes et overskueligt semistatisk udskiftningsinterval (f.eks. udskiftning hver 24. time). I disse tilfælde skal eksponeringskoncentrationerne verificeres som minimum i den højeste og den laveste testkoncentration ved begyndelsen og slutningen af hvert eksponeringsinterval (jf. punkt 36). Hvis der ikke kan opretholdes en eksponeringskoncentration på ± 20 % af de nominelle koncentrationer, skal alle koncentrationer måles ved begyndelsen og slutningen af hvert eksponeringsinterval (jf. punkt 36). Ved udskiftning bør det påses, at embryoner fortsat er dækket af en lille mængde af den gamle testopløsning, så de ikke tørrer ud. Testdesignet kan tilpasses, så det opfylder testkravene til specifikke stoffer (f.eks. gennemstrømning (24) eller passive doseringssystemer (25) i forbindelse med let nedbrydelige eller meget adsorptive

▼M7

stoffer (29) eller andre for flygtige stoffer (36) (37)). Under alle omstændigheder bør der drages omsorg for at minimere stress for embryonerne. Testkamrene bør konditioneres i mindst 24 timer med testopløsningerne, inden testen påbegyndes. Testbetingelserne er opsummeret i tillæg 2.

Testkoncentrationer

20. Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikaliet med en konstant afstandsfaktor, som ikke overstiger 2,2, for at opfylde de statistiske krav. Det bør begrundes, såfremt der anvendes færre end fem koncentrationer. Den højeste testede koncentration bør helst medføre 100 % dødelighed, mens den laveste koncentration helst ikke må medføre nogen observerbar effekt som defineret i punkt 28. En fortest inden den endelige test gør det muligt at vælge et passende koncentrationsinterval. Fortesten udføres typisk med 10 embryoner pr. koncentration. Følgende instruktioner henviser til udførelse af testen i plader med 24 brønde. Hvis der anvendes andre testkamre (f.eks. små petriskåle), eller hvis der testes flere koncentrationer, skal instruktionerne justeres i overensstemmelse hermed.

21. Nærmere oplysninger og visuelle instruktioner vedrørende allokering af koncentrationer i plader med 24 brønde findes i punkt 27 og tillæg 4, figur 1.

Kontroller

22. Det er nødvendigt at foretage kontrol af fortyndingsvand, både som negativ kontrol og som intern pladekontrol. Hvis der observeres mere end et dødt embryo i den interne pladekontrol, afvises pladen, og dermed reduceres antallet af koncentrationer, der bruges til at udlede LC_{50}. Hvis en hel plade afvises, kan det blive vanskeligt at vurdere og udlede observerede virkninger, især hvis den afviste plade er pladen til opløsningsmiddelkontrol eller en plade, hvori de behandlede embryoner også påvirkes. I det første tilfælde skal testen gentages. I det andet tilfælde kan tabet af en hel behandlingsgruppe på grund af dødelighed i den interne kontrol begrænse evnen til at vurdere virkningerne og bestemme LC_{50}-værdier.

23. Der udføres en positiv kontrol i en fast koncentration på 4 mg/l 3,4-dichloranilin med hvert parti æg, der anvendes til testen.

24. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, eksponeres endnu en gruppe på 20 embryoner for opløsningsmidlet på en separat plade med 24 brønde, som dermed fungerer som opløsningsmiddelkontrol. For at anse testen for at være acceptabel bør det påvises, at opløsningsmidlet ikke har nogen signifikant virkning på klækningstid og overlevelse og ikke har andre skadelige virkninger på embryonerne (jf. punkt 8c).

Påbegyndelse af eksponering og testens varighed

25. Testen påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtningen af æggene og afsluttes efter 96 timers eksponering. Embryonerne bør nedsænkes i testopløsningerne, inden blastocysten begynder at dele sig eller senest inden fasen med 16 celler. For at påbegynde eksponeringen med den mindst mulige forsinkelse udvælges mindst dobbelt så mange æg, som der er behov for, for hver behandlingsgruppe, og overføres til de respektive koncentrationer og kontroller (f.eks. i krystallisationsskåle på 100 ml; æggene bør være helt dækket) senest 90 minutter efter befrugtningen.

26. Levedygtige befrugtede æg bør adskilles fra ubefrugtede æg og overføres til plader med 24 brønde forkonditioneret i 24 timer og genopfyldes med 2 ml/brønd frisk fremstillede testopløsninger inden for 180 minutter efter befrugtning. Ved hjælp af stereomikroskopi (helst $\geq$ 30-fold forstørrelse) udvælges befrugtede æg, som er ved at dele sig og ikke udviser synlige

▼M7

uregelmæssigheder under delingen (f.eks. asymmetri, vesikeldannelse) eller skader på chorion. Vedrørende indsamling af æg og adskillelse, se tillæg 3, fig. 1 og 3, og tillæg 4, fig. 2.

Fordeling af æg i plader med 24 brønde

27. Æggene fordeles i brøndplader som følger (jf. også bilag 4, fig. 1)

— 20 æg på en plade for hver testkoncentration.

— 20 æg som opløsningsmiddelkontrol på en plade (om nødvendigt)

— 20 æg som positiv kontrol på en plade

— 4 æg i fortyndingsvand som intern pladekontrol på hver af ovennævnte plader

— 24 æg i fortyndingsvand som negativ kontrol på en plade.

Observationer

28. Apikale observationer foretaget på hvert testet embryon omfatter: koagulering af embryoner, manglende dannelse af somitter, manglende løsnen af halen og manglende hjerteslag (tabel 1). Disse observationer anvendes til at bestemme dødeligheden: Et positivt resultat i en af disse observationer betyder, at zebrafiskembryonet er dødt. Desuden registreres klækning i behandlings- og kontrolgrupper dagligt fra 48 timer. Observationer registreres hver 24. time indtil testens slutning.

Tabel 1

Apikale observationer af akut toksicitet i zebrafiskembryoner 24-96 timer efter befrugtning

	Eksponeringstid			
	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer
Koagulerede embryoner	+	+	+	+
Manglende dannelse af somitter	+	+	+	+
Manglende løsnen af halen	+	+	+	+
Manglende hjerteslag		+	+	+

29. *Koagulering af embryonet:* Koagulerede embryoner er mælkehvide og ser mørke ud under mikroskop (jf. tillæg 5, fig. 1). Antallet af koagulerede embryoner bestemmes efter 24, 48, 72 og 96 timer.

30. *Manglende dannelse af somitter:* Ved 26 ± 1 °C er der efter 24 timer dannet ca. 20 somitter (jf. tillæg 5, figur 2) i et normalt udviklet zebrafiskembryon. Et normalt udviklet embryon viser spontane bevægelser (kontraktioner fra side til side). Spontane bevægelser viser dannelse af somitter. Manglende somitter registreres efter 24, 48, 72 og 96 timer. Manglende dannelse af somitter efter 24 timer kan skyldes en generel forsinkelse i udviklingen. Senest efter 48 timer bør dannelsen af somitter være udviklet. Hvis ikke betragtes embryonerne som døde.

31. *Manglende løsnen af halen:* På et normalt udviklet zebrafiskeembryon observeres løsnen af halen (jf. tillæg 5, figur 3) fra blommen efter forlængelse

▼M7

bagud af embryonets legeme. Manglende løsnen af halen registreres efter 24, 48, 72 og 96 timer.

32. *Manglende hjerteslag:* Ved 26 ± 1 °C er der i et normalt udviklet zebrafiskeembryon et synligt hjerteslag efter 48 timer (jf. tillæg 5, figur 4). Der bør udvises særlig omhu ved registrering af dette endepunkt, da uregelmæssige (ujævne) hjerteslag *ikke* skal registreres som dødelige. Endvidere anses et synligt hjerteslag uden omløb i aorta abdominalis som ikke-dødeligt. For at registrere dette endepunkt bør embryoner, der ikke viser noget hjerteslag. observeres i en forstørrelse på mindst 80x i mindst et minut. Manglende hjerteslag registreres efter 48, 72 og 96 timer.

33. Klækning af alle behandlings- og kontrolgrupper bør registreres fra 48 timer og fremefter og rapporteres. Selv om klækning ikke er et endepunkt, som anvendes til beregning af LC_{50}, sikrer klækning, at embryonet eksponeres uden chorions potentielle barrierefunktion, og dette kan være en hjælp til fortolkning af data.

34. Detaljerede beskrivelser af normalen (35) og eksempler på unormal udvikling af zebrafiskeembryoner er vist i tillæg 3 og 5.

Analysemålinger

35. Ved begyndelsen og afslutningen af testen måles pH, hårdhedsgrad og ledningsevne i kontrolgruppen/-erne og i den højeste koncentration af testkemikaliet. I semistatiske udskiftningssystemer bør pH måles før og efter vandudskiftning. Koncentrationen af opløst ilt måles ved testens afslutning i de negative kontroller og den højeste testkoncentration for levedygtige embryoner, som bør opfylde validitetskriterierne for testen (jf. punkt 8f). Hvis der er bekymring for, at temperaturen varierer for pladerne med 24 brønde, måles temperaturen i tre tilfældigt udvalgte beholdere. Temperaturen bør helst registreres kontinuerligt under testen eller som minimum dagligt.

36. Koncentrationen af testkemikaliet bør som minimum måles ved den højeste og laveste testkoncentration, men helst i alle behandlinger, ved testens begyndelse og slutning. Ved semistatiske test (udskiftningstest), hvor testkemikaliets koncentration forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet og umiddelbart inden udskiftning. I forbindelse med test, hvor testkemikaliet ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, skal alle testkoncentrationer analyseres, når de er frisk fremstillede og umiddelbart inden udskiftning. I tilfælde af en utilstrækkelig analysevolumen kan det være nyttigt at sammenlægge testopløsninger eller anvende surrogatkamre af samme materiale og med samme forhold mellem rumfang og overfladeareal som plader med 24 brønde. Det anbefales stærkt, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Når koncentrationerne ikke holder sig inden for 80-120 % af den nominelle koncentration, bør effektkoncentrationerne udtrykkes i forhold til den geometriske middelværdi af de målte koncentrationer, se kapitel 5 i OECD's vejledning: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (28).

GRÆNSETEST

37. Med den i denne metode beskrevne fremgangsmåde kan der udføres en grænsetest ved 100 mg/l testkemikalie, dog ikke højere end kemikaliets opløselighed i testmediet, med henblik på at godtgøre, at LC_{50} er større end denne koncentration. Grænsetesten bør udføres med 20 embryoner i behandlingen, den positive kontrol og — om nødvendigt — opløsningsmiddelkontrollen og 24 embryoner i den negative kontrol. Hvis den procentvise dødelighed ved den testede koncentration overstiger dødeligheden i den negative kontrol (eller opløsningsmiddelkontrollen) med 10 %, bør der

▼M7

udføres en komplet test. Observerede virkninger bør registreres. Hvis dødeligheden overstiger 10 % i den negative kontrol (eller opløsningsmiddelkontrollen), bliver testen ugyldig og bør gentages.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

38. I denne test betragtes de enkelte brønde som uafhængige paralleller til statistisk analyse. Der optegnes en kurve over procentdel embryoner, hvor mindst en af de apikale observationer er positiv ved 48 og/eller 96 timer, i forhold til testkoncentrationer. Til beregning af kurvens hældning, LC_{50}-værdier og konfidensgrænser (95 %) bør der anvendes passende statistiske metoder (38), og OECD's vejledning: Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data bør konsulteres (39).

Testrapport

39. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

Stof med kun en bestanddel

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testorganismer:

— videnskabeligt navn, stamme, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

Testbetingelser:

— testprocedure (f.eks. semistatisk udskiftning)

— lysperiode

— testdesign (f.eks. antal testkamre, typer kontrol)

— kvalitetskarakteristika for vandet ved hold af fisk (f.eks. pH, hårdhedsgrad, temperatur, ledningsevne og opløst ilt)

— koncentration af opløst ilt, pH, samlet hårdhedsgrad, temperatur og ledningsevne for testopløsningerne i starten og efter 96 timer

— metode til fremstilling af stamopløsninger og testopløsninger samt hyppighed af udskiftninger

▼M7

— begrundelse for brug af bærestof og begrundelse for valg af opløsningsmiddel, hvis dette ikke er vand

— de nominelle testkoncentrationer og resultatet af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i testbeholderne; metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænsen (LoQ) bør også rapporteres

— bevis på, at kontrollerne opfyldte de generelle validitetskriterier for overlevelse

— æggenes befrugtningshastighed

— klækningshastighed i behandlings- og kontrolgrupper

Resultater:

— højeste koncentration, der ikke forårsager dødelighed inden for testperioden

— mindste koncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden

— kumulativ dødelighed for hver koncentration på de anbefalede observationstidspunkter

— LC_{50}- værdier efter 96 timer (og eventuelt efter 48 timer) for dødelighed med 95 %-konfidensgrænser, hvis det er muligt

— afbildning af koncentration/dødelighedskurve ved testens afslutning

— dødelighed i kontrollerne (negative kontroller, interne pladekontroller samt positiv kontrol og anvendte opløsningsmiddelkontroller)

— oplysninger om resultatet af hver af de fire apikale observationer

— forekomst og beskrivelse af eventuelle morfologiske og fysiologiske abnormiteter (jf. eksemplerne i tillæg 5, figur 2)

— hændelser i løbet af testen, der kan have påvirket resultaterne

— statistisk analyse og behandling af data (probabalistiske analyser, model for logistisk regression og geometrisk middelværdi for LC_{50})

— hældning og konfidensgrænser for regression af den (transformerede) koncentration/respons-kurve.

Afvigelser fra forsøgsmetoden og relevante forklaringer.

Diskussion og fortolkning af resultater.

LITTERATUR

1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. og Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry, 32: 1768-1783.

16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209.

17) Chapter C.4 of this Annex: Ready Biodegradability.

18) Chapter C.29 of this Annex: Ready Biodegradability, CO_2 in sealed vessels.

19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

23) Kapitel C.48 i dette bilag: Assayet for fisks reproduktion på kort sigt. Se tillæg 4a.

24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

27) ISO (1996) Internationale standarder. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].

28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. udgave. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

32) Europa-Kommissionen (2007) Kommissionens henstilling 2007/526/EF af 18. juni 2007 om retningslinjer for anbringelse og pasning af dyr, der anvendes til test og andre videnskabelige formål (meddelt under nummer K(2007) 2525) ([http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:DA:PDF]

33) EU (2010) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. Den EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33-79.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:DA:PDF

34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

36) Kapitel C.2 i dette bilag: Daphnia sp., Akut immobilisationstest.

37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978.

38) ISO (2006) International standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Findes her: [http://www.iso.org].

39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper »Fish embryo toxicity assays«. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Apikalt endepunkt: Forårsager en virkning på populationsniveau.

Blastula: En celledannelse rundt om dyrets poler, som omfatter en bestemt del af blommen.

Kemikalie: Et stof eller en blanding

Epiboli: En massiv spredning af overvejende epidermale celler i embryonets gastrulationsfase og deres bevægelse fra den dorsale til den ventrale side, hvorved entodermale cellelag internaliseres i en invaginationslignende proces, og blommen indføres i embryonet.

Gennemstrømningstest: En test med en stadig strøm af testopløsninger gennem testsystemet under hele eksponeringen.

Intern pladekontrol: Intern kontrol bestående af fire brønde fyldt med fortyndingsvand pr. plade med 24 brønde, som producenten eller forskeren bruger til at identificere potentiel forurening af pladerne under proceduren samt eventuel pladevirkning, som kan påvirke resultatet af testen (f.eks. temperaturgradient).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Den Internationale Union for Ren og Anvendt Kemi).

Vedligeholdelsesvand: Det vand, som de voksne fisk dyrkes i.

Middel dødelig koncentration (LC_{50}): Den koncentration af testkemikaliet, som skønnes at være dødelig for 50 % af testorganismerne i løbet af testens varighed.

Semistatisk udskiftningstest: En test med regelmæssig udskiftning af testopløsningerne efter fastlagte perioder (f.eks. hver 24. time).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Somit: I hvirveldyrembryoner under udvikling er somitter masser af mesoderm fordelt lateralt til neuralrøret, der i sidste ende vil udvikle dermis (dermatom), skeletmuskulatur (myotom) og ryghvirvler (sclerotom).

Statisk test: En test, hvor testopløsningerne ikke ændres i løbet af testen.

Testkemikalie: Et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

▼M7

Tillæg 2

VEDLIGEHOLDELSE, AVL OG TYPISKE BETINGELSER FOR TEST AF AKUT TOKSICITET FOR ZEBRAFISKEMBRYONER

		Zebrafisk (*Danio rerio*)
Arternes oprindelse		Indien, Burma, Malakka, Sumatra
Kønsdimorfi		Hunner: fremspringende mave, når de bærer æg Hanner: mere slank, orange skær mellem blå langsgående striber (især synlige ved halefinnen)
Fodring		Tørfoder (maks. 3 % af fiskens vægt pr. dag) 3-5 gange dagligt; derudover saltsøkrebs (*Artemia* spec.) *nauplii* og/eller små dafnier af passende størrelse fra en ikke-forurenet kilde. Fodring med levende foder er en kilde til miljøberigelse, og der bør derfor så vidt muligt anvendes levende foder. For at sikre optimal vandkvalitet bør overskydende foder og ekskrementer fjernes ca. en time efter fodring.
Voksne fisks omtrentlige vægt		Hunner: 0,65 ±0,13 g Hanner: 0,5 ±0,1 g
Vedligeholdelse af forældrefisk	Belysning	Lysstofrør (bredt spektrum); 10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (laboratorieniveau); 12-16 timers lysperiode
	Vandtemperatur	26 ± 1 °C
	Vandkvalitet	O_2 ≥ 80 % mætning, hårdhed, f.eks. ~ 30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ og NO_2^-: < 0,001 mg/l, restchlor < 10 μg/l, total mængde organisk chlor < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5
	Yderligere vandkvalitetskriterier	Partikler < 20 mg/l, total mængde organisk kulstof < 2 mg/l, total mængde organiske fosforpesticider < 50 ng/l, total mængde organiske chlorpesticider plus polychlorerede biphenyler < 50 ng/l
	Størrelse af vedligeholdelsestank	F.eks. 180 l, 1 fisk/l
	Vandrensning	Fast (kulfiltreret); andre muligheder omfatter kombinationer med halvstatisk udskiftningsvedligeholdelse eller gennemstrømningssystem med kontinuerlig vandudskiftning
	Anbefalede forhold mellem hanner og hunner til avl	2:1 (eller massegydning)
Gydetanke		F.eks. 4-liters tanke forsynet med bund af stålgitter og planteattrap til at stimulere gydning; udvendige varmemåtter eller massegydning i vedligeholdelsestanke
Æggenes struktur og udseende		Stabil chorion (dvs. meget gennemsigtig, ikke-klæbrig, diameter ~ 0,8-1,5 mm)
Gydefrekvens		En enkelt moden hunfisk gyder mindst 50-80 æg pr. dag. Afhængigt af stammen kan gydefrekvensen være betydeligt højere. Befrugtningsfrekvensen bør være ≥ 70 %. For fisk, der skal gyde første gang, kan befrugtningsfrekvensen for æggene være lavere i de første par gydninger.
Testtype		Statisk, semistatisk udskiftning, gennemstrømning, 26 ± 1 °C, 24 timers konditionerede testbeholdere (f.eks. plader med 24 brønde, 2,5-5 ml pr. brønd)

▼M7

Tillæg 3

NORMAL UDVIKLING HOS ZEBRAFISK VED 26 °C

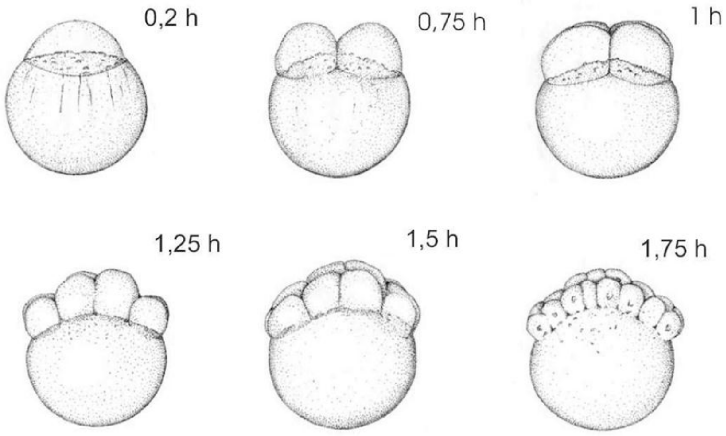


Fig. 1: Udvalgte faser af tidlig udvikling hos zebrafisk (Danio rerio): 0,2-1,75 timer efter befrugtningen (fra Kimmel et al., 1995 (35)). Tidssekvensen for normal udvikling kan anvendes til at diagnosticere både befrugtning og æggenes levedygtighed (jf. punkt 26: Udvælgelse af befrugtede æg).

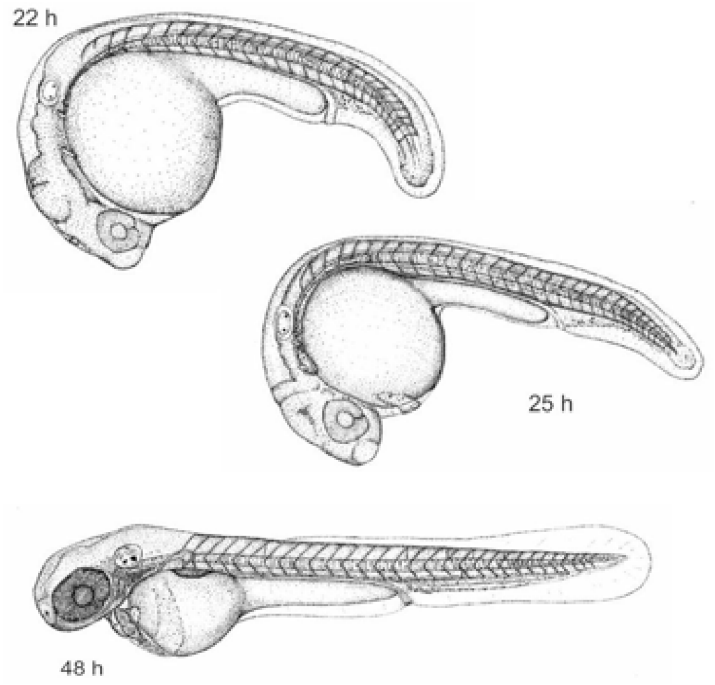


Fig. 2: Udvalgte faser af sen udvikling hos zebrafisk (*Danio rerio*) (embryoner uden chorion for optimal synlighed): 22-48 timer efter befrugtning (fra Kimmel et al., 1995 (35)).

▼M7

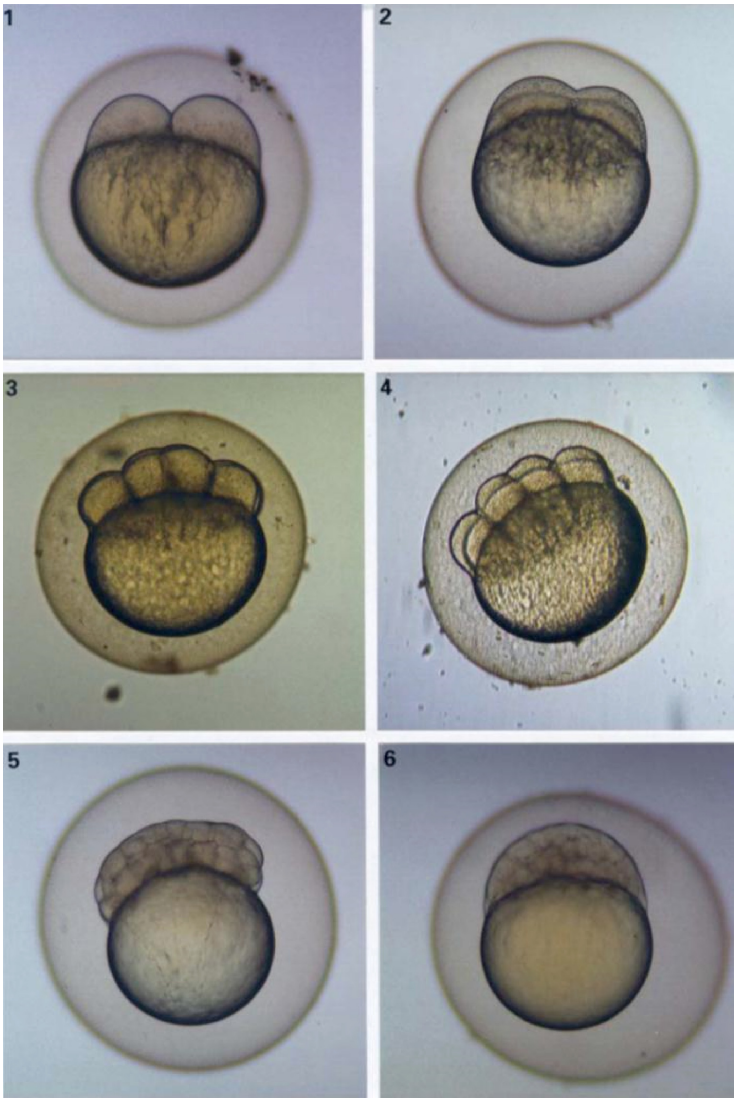


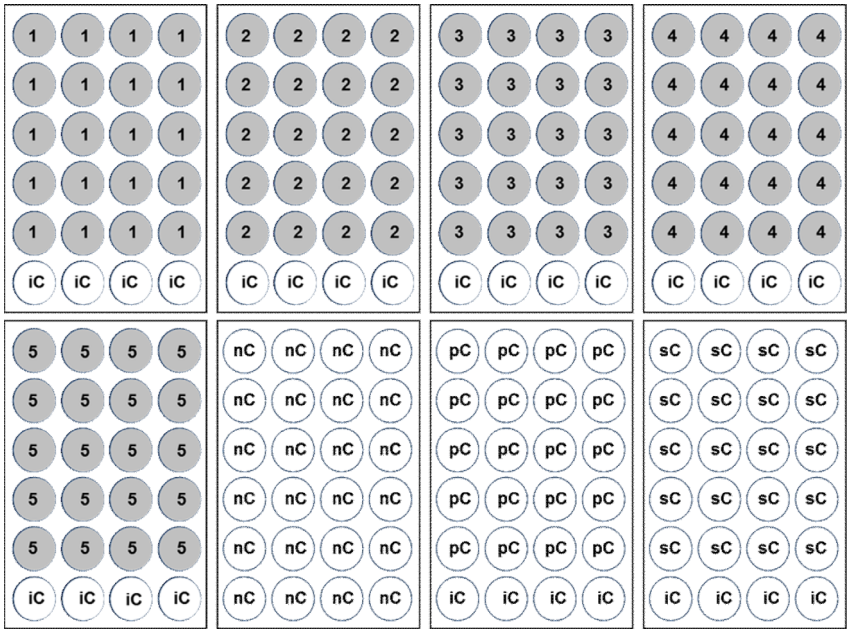
Fig. 3: Normal udvikling hos zebrafiskembryoner (Danio rerio): 1) 0,75 timer, 2-cellefase, 2) 1 time, 4-cellefase, 3) 1,2 timer, 8-cellefase, 4) 1,5 timer, 16-cellefase, 5) 4,7 timer, begyndende epiboli og 6) 5,3 timer, ca. 50 % epiboli (fra Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Tillæg 4

Fig. 1

Layout af plader med 24 brønde



1-5 = fem testkoncentrationer/kemikalie;

nC = negativ kontrol (fortyndingsvand),

iC = intern pladekontrol (fortyndingsvand)

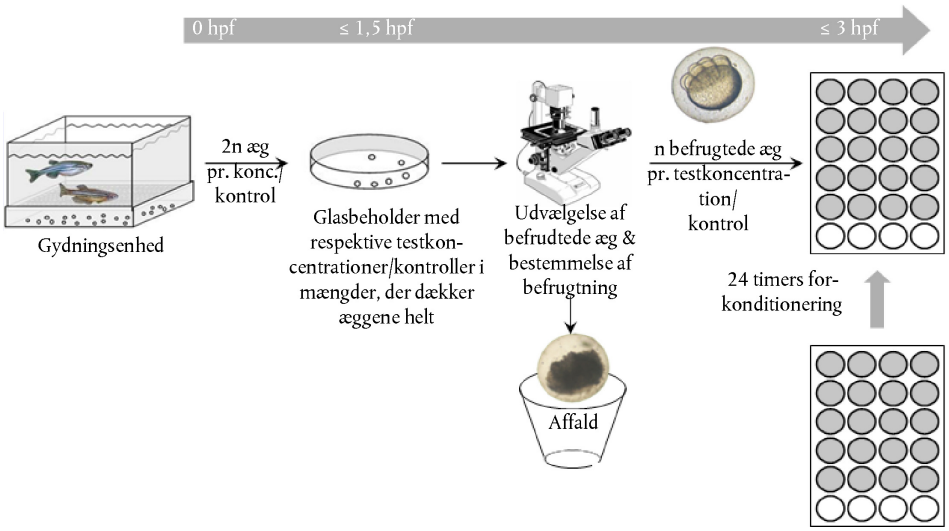
pC = positiv kontrol (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = opløsningsmiddelkontrol

▼M7

Fig. 2

Oversigt over testproceduren for akut toksicitet for zebrafiskembryoner (fra venstre mod højre): produktion af æg, indsamling af æg, præeksponering umiddelbart efter befrugtning i glasbeholdere, udvælgelse af befrugtede æg med inverteret mikroskop eller kikkert og fordeling af befrugtede æg i plader med 24 brønde med de respektive testkoncentrationer/kontroller, n = antal æg, der kræves pr. testkoncentration/kontrol (her 20), hpf = timer efter befrugtning.



▼M7

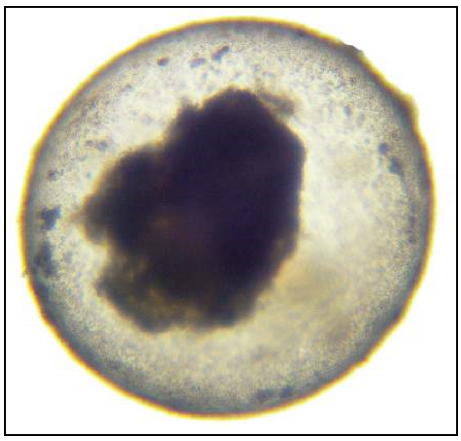
Tillæg 5

OVERSIGT OVER DØDELIGE ENDEPUNKTER FOR TESTEN FOR AKUT TOKSICITET FOR ZEBRAFISKEMBRYONER

Følgende apikale endepunkter angiver akut toksicitet og dermed død for embryonerne: *koagulering af embryonet, manglende løsnen af halen, manglende dannelse af somitter og manglende hjerteslag*. Følgende mikrografer er blevet udvalgt til at illustrere disse endepunkter.

Fig. 1

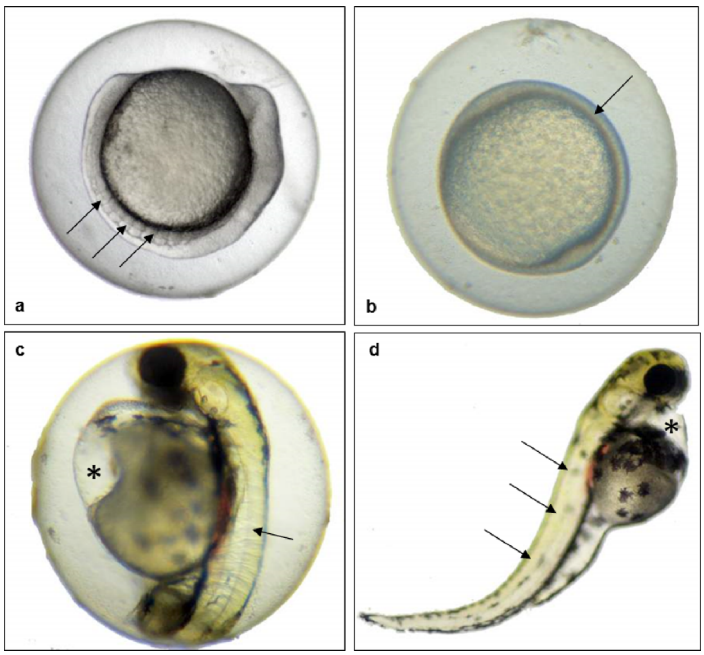
Koagulering af embryonet



Under lysfeltbelysning viser koagulerede zebrafiskembryoner en række intransparente inklusioner.

Fig. 2

Manglende dannelse af somitter

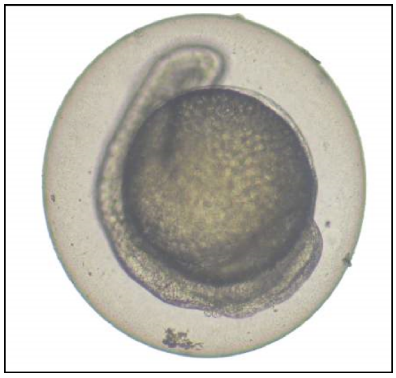


▼M7

Selv om udviklingen forsinkes med ca. 10 timer, viser det 24 timer gamle zebrafiskembryon i a) veludviklede somitter (→), mens embryonet i b) ikke viser tegn på dannelse af somitter (→). Selv om det 48 timer gamle zebrafiskembryon i c) klart viser et ødem i blommesækken (*), ses der tydeligt dannelse af somitter (→), mens det 96 timer gamle zebrafiskembryon i d) ikke udviser tegn på dannelse af somitter (→). Bemærk også rygmarvskrumningen (scoliose) og det pericardiale ødem (*) vist i d).

Fig. 3

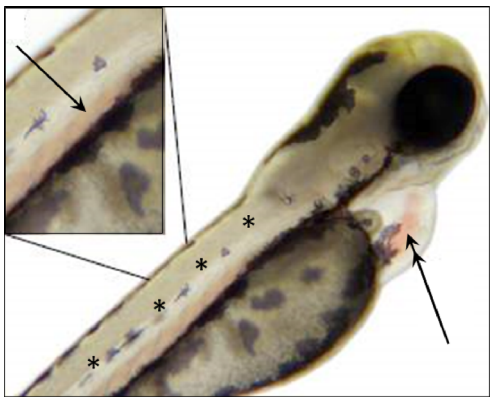
Manglende løsnen af halen i lateral visning



(a: →; 96 timer gammelt zebrafiskembryon). Bemærk også det manglende øje (*).

Fig. 4

Manglende hjerteslag



Manglende hjerteslag er, pr. definition, vanskeligt at illustrere i en mikrograf. Manglende hjerteslag angives med manglende sammentrækninger i hjertet (dobbeltpil). Immobile blodceller i f.eks. aorta abdominalis (→ i indsats) er ikke indikator for manglende hjerteslag. Bemærk også den manglende dannelse af somitter i dette embryon (*, homogent snarere end segmentarisk udseende muskelvæv). Observationstiden for at registrere manglende hjerteslag bør være mindst et minut med en forstørrelse på mindst 80×.

▼M7

C.50. TOKSICITETSTEST AF SEDIMENTFRI *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 238 (2014). Den er beregnet til at vurdere toksiciteten af kemikalier for *Myriophyllum spicatum*, en tokimbladet undervandsplante, som er en art i tusindbladsfamilien. Det er baseret på en eksisterende ASTM-forsøgsmetode (1), som er ændret som et sedimentfrit testsystem (2) for at anslå testkemikaliets iboende økotoksicitet (uafhængigt af testkemikaliets fordelingsadfærd mellem vand og sedimenter). Et testsystem uden sediment har lav analytisk kompleksitet (kun i vandfasen), og resultaterne kan analyseres parallelt og/eller sammenlignes med de resultater, der opnås i *Lemna sp.*-tests (3). Derudover betyder de krævede sterile forhold, at virkningerne af mikroorganismer og alger (kemikalieoptagelse/nedbrydning mv.) så vidt muligt kan begrænses. Denne test erstatter ikke andre akvatiske toksicitetstest, men bør derimod supplere dem, så der kan foretages en mere fuldstændig fare- og risikovurdering af vandplanter. Forsøgsmetoden er blevet valideret ved en ringtest (4).

2. Der gives en nærmere beskrivelse af testen med udskiftning af testopløsningen (semistatisk test) og uden udskiftning (statisk). Afhængigt af målsætningen for testen og myndighedernes krav anbefales det at bruge den semistatiske metode, f.eks. til stoffer, der hurtigt forlader opløsningen ved fordampning, adsorption, fotonedbrydning, hydrolyse, udfældning eller bionedbrydning. Nærmere anvisninger er givet i (5). Denne metode gælder for stoffer, som forsøgsmetoden er valideret for (se nærmere oplysninger i ringtestrapporten (4)), eller formuleringer eller kendte blandinger. Hvis en blanding testes, bør dens indhold så vidt muligt identificeres og kvantificeres. Forsøgsmetoden for sedimentfri *Myriophyllum spicatum* supplerer toksicitetstesten for vandsedimentet *Myriophyllum spicatum* (6). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Plantekulturer af *Myriophyllum spicatum* (kun i modificeret Andrews-medie, se tillæg 2), som dyrkes kontinuerligt, må dyrkes som monokulturer i forskellige koncentrationer af testkemikaliet over en periode på 14 dage i et sedimentfrit testsystem. Testens formål er at kvantificere kemikalierelaterede virkninger på den vegetative vækst i dette tidsrum, baseret på vurdering af udvalgte målevariable. Målevariablene er væksten i skuddene i længden, af sidegrene og rødder samt udvikling af frisk- og tørvægt og forøgelse af grenkranse. Desuden tages der hensyn til særlige kvalitative ændringer i testorganismer såsom vansiring eller chlorose og nekrose, som kan ses ved gulnede eller hvide og brune farver. De kemikalierelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrollerne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % af væksthastigheden, og som betegnes EC_x; »x« kan være en vilkårlig værdi afhængigt af lovkravene, f.eks. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Det bør bemærkes, at estimater af EC_{10}- og EC_{20}-værdier kun er pålidelige og relevante i test, hvor variationskoefficienterne i kontrolplanterne falder til under det anslåede effektniveau, dvs. variationskoefficienterne bør være < 20 % for at give et robust skøn af EC_{20}.

4. Både den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (anslået ud fra vurderinger af længden af hovedskuddene og tre yderligere målevariable) og udbytte (anslået ud fra den øgede længde af hovedskuddene og tre yderligere målevariable) af ubehandlede og behandlede planter bør bestemmes. Den

▼M7

specifikke vækshastighed (r) og udbyttet (y) anvendes efterfølgende til at bestemme henholdsvis E_rC_x (f.eks. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) og E_yC_x (f.eks. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

6. Der bør foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet i testmediet. Af oplysninger om testkemikaliet, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, renhed og urenheder, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, syrestyrkekonstant (pK_a) fordelingskoefficient octanol/vand (K_{ow}), damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikalie i løbet af testperioden. Derved fås en indikation af, om der bør træffes særlige skridt til at kontrollere sådanne tab. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse under testbetingelserne, dvs. med samme næringsmedium, temperatur og belysning som i testen.

7. Kontrollen af testmediets pH-værdi er særlig vigtig, f.eks. ved test af metaller eller stoffer, som er hydrolytisk ustabile. I OECD's vejledning (5) findes der yderligere vejledning i test af kemikalier, hvis fysisk-kemiske egenskaber vanskeliggør testen.

TESTENS GYLDIGHED

8. For at testen skal være gyldig, skal fordoblingstiden for længden af hovedskuddene være mindre end 14 dage. Med de medier og testbetingelser, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, kan dette kriterium opfyldes ved at gennemføre testen under statiske eller semistatiske betingelser.

9. Den gennemsnitlige variationskoefficient for udbytte baseret på målinger af vægten af friske skud (dvs. fra testen påbegyndes, til den afsluttes) og de supplerende målevariable (jf. punkt 37) i kontrolkulturerne må ikke overstige 35 % mellem replikaterne.

10. Mere end 50 % af replikaterne af kontrolgruppen holdes sterile i eksponeringsperioden på 14 dage, hvilket betyder, at de er synligt fri for forurening med andre organismer såsom alger, svampe og bakterier (klar opløsning). *Bemærk*: Vejledning i vurdering af sterilitet i ringtestraport (4).

REFERENCEKEMIKALIE

11. Referencekemikalie(r), f.eks. 3,5-dichlorphenol anvendt i ringtest (4), kan testes som en metode til at kontrollere forsøgsmetoden; på grundlag af ringtestdata ligger de gennemsnitlige EC_{50}-værdier for 3,5-DCP for de forskellige responsvariable (jf. punkt 37-41 i denne forsøgsmetode) mellem 3,2 mg/l og 6,9 mg/l (se ringtestrapporten for oplysninger om konfidensinterval for disse værdier). Det tilrådes, at test af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie.

▼M7

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

12. Alt udstyr, der kommer i berøring med testmedierne, bør være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Glasapparatur, der anvendes til dyrkning og test, bør være renset for kemiske kontaminanter, der kan udvaskes i testmediet, og bør være sterilt. Testbeholderne bør være lange nok til, at skuddet i kontrolbeholderne kan vokse i vandfasen uden dog at nå op til overfladen af testmediet ved testens afslutning. Det anbefales at anvende tykvæggede reagensglas af borsilikat uden kant med en indvendig diameter på ca. 20 mm, en længde på ca. 250 mm og aluminiumslukkekapsler.

13. Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (der stimulerer væksten af svampe og bakterier), skal testopløsningerne fremstilles under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft (210 °C) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved 121 °C. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

14. Kulturerne og testbeholderne bør ikke opbevares sammen. Dette opnås bedst ved, at klimakamre, inkubatorer eller lokaler er separate. Belysning og temperatur bør kunne reguleres og holdes på et konstant niveau.

Testorganisme

15. *Myriophyllum spicatum* — en tokimbladet undervandsplante — er en art i tusindbladsfamilien. Mellem juni og august stikker diskrete rosa-hvide blomster op over vandoverfladen. Planternes rødder er et system af robuste jordstængler og findes på hele den nordlige halvkugle i eutrofisk, men ikke forurenet og mere kalkholdigt stille vand med mudret underlag. *Myriophyllum spicatum* foretrækker ferskvand, men findes også i brakvand.

16. Til en sedimentfri toksicitetstest skal der anvendes sterile planter. Hvis testlaboratoriet ikke har regelmæssige kulturer af *Myriophyllum spicatum*, kan der indhentes sterilt plantemateriale fra et andet laboratorium, eller der kan hentes (ikke-sterilt) plantemateriale i felten eller fra en kommerciel leverandør; hvis planterne indhentes i felten, bør der foretages en taksonomisk verifikation af arten. Er planterne indsamlet i felten eller leveret af en kommerciel leverandør, bør de steriliseres (1) og opbevares i mindst otte uger i kultur i samme medium, som benyttes til test, før de anvendes. Indsamlingssteder for startkulturer i felten skal være fri for åbenbare forureningskilder. Der bør udvises stor forsigtighed for at sikre, at der indsamles de korrekte arter af *Myriophyllum spicatum* i felten, især i områder, hvor den kan hybridiseres med andre *Myriophyllum*-arter. Hvis de leveres fra et andet laboratorium, skal de opbevares på tilsvarende måde i mindst tre uger. Kilden til plantematerialet og den testede art bør altid rapporteres.

17. De testede planters kvalitet og ensartethed har stor indflydelse på testresultatet, hvorfor de bør udvælges nøje. Der bør anvendes unge, hurtigtvoksende planter uden synlige forandringer eller misfarvning (chlorose). Nærmere oplysninger om klargøring af testorganismen findes i tillæg 4.

Dyrkning

18. For at undgå at skulle vedligeholde kulturerne så ofte (f.eks. når *Myriophyllum*-test ikke påtænkes anvendt i en periode), kan kulturerne opbevares ved reduceret belysning og temperatur (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). En nærmere beskrivelse af dyrkningen er givet i tillæg 3.

▼M7

19. Mindst 14 til 21 dage før test overføres et tilstrækkeligt antal testorganismer aseptisk til frisk, sterilt medium og dyrkes i 14 til 21 dage under testbetingelserne som en prækultur. Oplysninger om fremstilling af en prækultur findes i tillæg 4.

Testmedium

20. Der anbefales kun et næringsmedium til *Myriophyllum spicatum* i et sedimentfrit testsystem som beskrevet i tillæg 2. Det anbefales at modificere Andrews-medium til dyrkning af og test med *Myriophyllum spicatum* som beskrevet i (1). Fra fem særskilt udarbejdede stamopløsninger tilsat 3 % saccharose fremstilles det modificerede Andrews-medium. Oplysninger om fremstilling af et medum findes i tillæg 2.

21. Der skal anvendes et 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium til at opnå testopløsninger (ved fortynding hvor det er relevant). Sammensætningen af dette medium er givet i tillæg 2.

Testopløsninger

22. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningerne af testkemikaliet fremstilles normalt ved opløsning af kemikaliet i demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand. Tilsætning af næringsstoffer opnås ved at anvende 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium.

23. Stamopløsningerne af testkemikaliet kan steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 20 minutter eller ved sterilfiltrering, forudsat at steriliseringsteknikken ikke denaturerer testkemikaliet. Testopløsninger kan også fremstilles i sterilt demineraliseret vand eller medium under sterile forhold. Der bør tages højde for varmestabilitet og adsorption på forskellige overflader ved udvælgelsen af sterilisationsproceduren for testkemikaliets stamopløsninger. Derfor anbefales det, at stamopløsningerne fremstilles under sterile forhold, dvs. ved hjælp af sterilt materiale, der kan opløse testkemikaliet under sterile forhold (f.eks. flammesterilisation, laminar strømningskappe mv.) i sterilt vand. Denne teknik til fremstilling af sterile stamopløsninger gælder både stoffer og blandinger.

24. Den højeste testede koncentration af testkemikaliet bør sædvanligvis ikke være større end kemikaliets vandopløselighed under testbetingelserne. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliet ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikalie til testmediet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne midler bør så vidt muligt søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler bør ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration rapporteres og holdes så lav som mulig (≤ 100 µl/l), og der bør være samme koncentration af opløsnings- eller dispergeringsmiddel i alle behandlings- og kontrolgrupper. Nærmere anvisninger kan findes i (5).

Test- og kontrolgrupper

25. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til testkemikaliets toksicitet for *Myriophyllum spicatum*, f.eks. fra en test til bestemmelse af dosisinterval. I den endelige toksicitetstest bør der normalt være fem (som i *Lemna*-vækshæmningstesten, kapitel C.26 i dette bilag) til syv testkoncentrationer arrangeret i en geometrisk serie; de bør vælges således, at NOEC og EC_{50} ligger i intervallet mellem den højeste og

▼M7

laveste koncentration (jf. nedenfor). Kvotienten mellem testkoncentrationerne bør helst ikke være over 3,2, men kan dog være større, når koncentration/respons-kurven er flad. Det bør begrundes, såfremt der anvendes færre end fem koncentrationer. Der bør anvendes mindst fem replikater for hver testkoncentration.

26. Ved fastsættelse af området for testkoncentrationerne (i den indledende test og/eller i den endelige toksicitetstest) bør følgende tages i betragtning:

Ved bestemmelse af en EC_x-værdi bør denne ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den skal blive bestemt med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC_{50}-værdi bør den højeste testkoncentration således være større end EC_{50}-værdien. Ligger EC_{50}-værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit.

Hvis målet er at bestemme en LOEC/NOEC-værdi, bør den laveste testkoncentration være så lav, at væksten ikke er væsentligt lavere end i kontrolprøven. Desuden bør den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrolprøven. Er det ikke tilfældet, må testen gentages med et andet koncentrationsområde (medmindre den højeste koncentration svarer til opløselighedsgrænsen eller til den maksimalt krævede grænsekoncentration, f.eks. 100 mg/l).

27. Hver test bør omfatte kontroller med samme næringsmedium, testorganisme (der vælges et så homogent plantemateriale som muligt, friske sidegrene fra prækulturer, forkortet til 2,5 cm fra roden), miljøforhold og procedurer som testbeholderne, men uden testkemikaliet. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør der indgå en ekstra kontrolbehandling med samme koncentration af opløsnings-/dispergeringsmiddel som i testbeholderne med testkemikalie. Der bør være mindst 10 replikate kontrolbeholdere (og beholdere med opløsningsmiddel, hvis det er relevant).

28. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der bør dog være mindst 10 replikater af kontrolprøverne.

Eksponering

29. Friske sidegrene fra prækultur afkortet til 2,5 cm fra roden fordeles tilfældigt i testbeholderne under aseptiske forhold; hver testbeholder bør indeholde en 2,5 cm lang sidegren, der bør have et apikalt meristem i den ene ende. Det valgte plantemateriale bør være af samme kvalitet i hver testbeholder.

30. Testbeholdernes placering i inkubatoren skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur. Desuden skal testen enten have blokdesign, eller også skal testbeholderne omplaceres tilfældigt ved hver observation (eller hyppigere).

31. Hvis en indledende stabilitetstest viser, at testkemikaliekoncentrationen ikke kan opretholdes (dvs. den målte koncentration kommer ned under 80 % af den målte startkoncentration) gennem hele testperioden (14 dage), anbefales et semistatisk testregime. Dette gennemføres ved, at planterne eksponeres for friskfremstillede test- og kontroloplosninger mindst to gange i løbet af testen (f.eks. på dag 7). Hyppigheden af eksponeringen for frisk medium afhænger

▼M7

af testkemikaliets stabilitet. Meget ustabile eller flygtige kemikalier kan kræve hyppigere eksponering, for at koncentrationerne kan holdes tilnærmelsesvis konstante.

32. Eksponeringsscenariet ved påføring på bladene (spray) er ikke omhandlet i denne forsøgsmetode.

Testbetingelser

33. Belysningen bør komme fra lysstofrør med »varmt« eller »køligt hvidt« lys med en styrke i området 100-150 μE m^{-2} s^{-1}, målt i det fotosyntetisk aktive spektrum (400-700 nm) i punkter med samme afstand fra lyskilden som bunden af testbeholderne (svarende til ca. 6 000-9 000 lux) og med en lys/mørke-cyklus på 16:8 timer. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevne.

34. Temperaturen i testbeholderne bør være 23 ± 2 °C. I særlige tilfælde, f.eks. test af ustabile kemikalier eller metaller, må der udvises ekstra opmærksomhed over for pH-afvigelse; pH-værdien bør ligge på 6-9. Nærmere vejledning er givet i (5).

Varighed

35. Testen afsluttes 14 dage efter, at planterne er overført til testbeholderne.

Målinger og analytiske bestemmelser

36. Ved testens begyndelse har testorganismens hovedskud en længde på 2,5 cm (jf. punkt 29); den måles med en lineal (jf. tillæg 4) eller ved fotografering og billedanalyse. Længden af testorganismens hovedskud med normalt og unormalt udseende bestemmes ved testens begyndelse, mindst en gang i løbet af den 14 dage lange eksponeringsperiode samt ved testens afslutning. Bemærk: Som et alternativ for dem, som ikke har billedanalyse, kan der, hvis arbejdsbænken steriliseres, inden planterne tilsættes testbeholdere, også bruges en steril lineal til at måle længden af hovedskuddet ved testens begyndelse og under testen. Ændringer i planternes udvikling, f.eks. deforme skud, udseende, tegn på nekrose, chlorose, opbrydning eller tab af flydeevne, samt i røddernes længde og udseende, bør registreres. Særlige kendetegn ved testmediet (f.eks. ikke-opløst materiale i testbeholderen eller algevækst, svampe eller bakterier på denne) bør ligeledes registreres.

37. Foruden at længden af hovedskuddet registreres under testen, bør testkemikaliets virkninger på tre (eller flere) af følgende målevariable også vurderes:

i. Samlede længde af sidegrene

ii. Samlet længde af skud

iii. Samlet længde af rødder

iv. Friskvægt

v. Tørvægt

vi. Antal grenkranse

▼M7

Bemærkning 1: De observationer, der er gjort i fortesten, vil kunne bidrage til at udvælge relevante yderligere målinger blandt de seks variable, der er anført ovenfor.

Bemærkning 2: Det er i høj grad ønskeligt, at frisk- og tørvægt (parameter iv og v) fastslås.

Bemærkning 3: Da saccharose og lys (hvis rødderne eksponeres for lys under testen) kan påvirke transportører af auxin (plantens væksthormon), og nogle kemikalier kan have en virkningsmekanisme af auxintypen, er optagelsen af rodens endepunkter (parameter iii) tvivlsom.

Bemærkning 4: Resultaterne af ringtesten viser høje variationskoefficienter (> 60 %) for den samlede længde af sidegrene (parameter i). Den samlede længde af sidegrene ligger under alle omstændigheder inden for målingen af det samlede hovedskud (parameter ii), som viser mere acceptable variationskoefficienter på < 30 %.

Bemærkning 5: Som følge af ovenstående anbefales følgende hovedmålinger af endepunkter: samlet længde af skud, frisk- og tørvægt (parameter ii, iv og v); parameter vi — antal grenkranse — overlades til forskerens afgørelse.

38. Fordelen ved at bruge længden af hovedskud og antal grenkranse er, at de kan bestemmes for hver test- og kontrolbeholder ved begyndelsen af, under og ved afslutningen af testen med fotografering og billedanalyse, selv om der også kan anvendes en (steril) lineal.

39. Den samlede længde af sidegrene, den samlede længde af roden (som summen af alle sidegrene eller rødder) og den samlede længde af skuddene (som summen af længden af hovedskuddene og længden af de sidegrene) kan måles med en lineal i slutningen af eksponeringen.

40. Tør- og/eller friskvægten bør bestemmes ved testens start på en prøve af prækulturen, der er repræsentativ for den, der anvendes til at begynde testen, samt ved testens slutning med plantemateriale fra hver test- og kontrolbeholder.

41. Samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse kan bestemmes som følger:

i. Samlet længde af sidegrene: Længden af sidegrene kan bestemmes ved at måle alle sidegrene med en lineal i slutningen af eksponeringen. Den samlede længde af sidegrene er summen af alle sidegrene for hver test- og kontrolbeholder.

ii. Samlet længde af skud: Længden af hovedskuddet kan bestemmes ved billedanalyse eller ved hjælp af en lineal. Den samlede længde af skuddene er summen af den samlede længde af sidegrene og den samlede længde af hovedskuddet for hver test- og kontrolbeholder i slutningen af eksponeringen.

iii. Samlet længde af rødder: Længden af rødderne kan bestemmes ved at måle alle rødder med en lineal i slutningen af eksponeringen. Den samlede længde af rødderne er summen af alle rødderne for hver test- og kontrolbeholder.

iv. Friskvægt: Friskvægten kan bestemmes ved at veje testorganismerne i slutningen af eksponeringen. Alt plantemateriale for hver test- og kontrolbeholder skylles med destilleret vand og dubbes tørt med cellulosepapir. Herefter bestemmes friskvægten ved vejning. Startbiomassen

▼M7

(friskvægten) bestemmes på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pode testbeholderne.

v. Tørvægt: Efter forberedelserne til bestemmelse af friskvægten tørres testorganismerne ved 60 °C til en konstant vægt. Denne masse er tørvægten. Startbiomassen (tørvægten) bestemmes på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pode testbeholderne.

vi. Antal grenkranse: Alle grenkranse tælles ud langs hovedskuddet.

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

42. Hvis testen udføres statisk, bør pH-værdien for hver behandling måles ved testens start og afslutning. Udføres testen semistatisk, bør der foretages pH-måling på hver portion »frisk« testopløsning før hver udskiftning foruden på de tilsvarende »brugte« opløsninger.

43. Lysintensiteten bør måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet i punkter med samme afstand til lyskilden som testorganismen. Målingerne bør foretages mindst en gang i løbet af testen. Mindst en gang dagligt bør temperaturen af mediet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i klimakammeret, inkubatoren eller lokalet (eller kontinuerligt med en datalogger) måles.

44. Under testen bestemmes testkemikaliekoncentration(er) med passende intervaller. Mindstekravet i statistiske test er bestemmelse af koncentrationerne ved testens begyndelse og afslutning.

45. I semistatiske test, hvor testkemikaliekoncentrationen ikke forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle friskfremstillede testopløsninger, og de samme opløsninger analyseres ved hver udskiftning. For de test, hvor den målte startkoncentration af testkemikaliet ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver testkoncentrationen før udskiftning kun bestemmes på en testbeholderreplikat ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).

46. Hvis det kan konstateres, at testkoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end ± 20 %, bør analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (5).

Grænsetest

47. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikaliet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over kemikaliets opløselighed i testmediet eller i tilfælde af en formulering op til grænsen af dens dispergeringsevne, kan der udføres en grænsetest, hvor responsen i en kontrolgruppe sammenholdes med responsen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det

▼M7

anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier finder anvendelse på en grænsetest bortset fra, at antallet af behandlingsreplikater bør fordobles. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

DATA OG RAPPORTERING

Responsvariable

48. Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på den vegetative vækst af *Myriophyllum spicatum*. Denne forsøgsmetode beskriver to responsvariable.

a) Gennemsnitlig specifik væksthastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i længden af hovedskuddet samt den logaritmiske ændring i andre måleparametre (samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) med tiden (udtrykt pr. dag) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Bemærkning: For måleparameteren samlet længde af sidegrene og samlet længde af rødder er det ikke muligt at foretage en beregning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed. Ved testens begyndelse har testorganismen ingen sidegrene og ingen rødder (baseret på fremstillingen af prækulturen); fra værdien nul er beregningen af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed ikke defineret.

b) Udbytte: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i længden af hovedskuddet samt ændringer i andre måleparametre — dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse og andre parametre, hvis dette anses for at være nyttigt — i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe indtil slutningen af testen.

49. Toksicitetsvurderinger bør baseres på længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse, jf. punkt 37 og bemærkning 2, 4 og 5 til dette punkt), fordi visse kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end længden af hovedskuddet. Denne virkning ville ikke blive opdaget ved alene at benytte længden af hovedskuddet i beregningen.

Gennemsnitlig specifik væksthastighed

50. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i vækstvariablene — længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) — ved hjælp af nedenstående formel for hver replikat af kontrol og behandlingsprøve:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

hvor:

μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

N_i er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

N_j er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

t er tidsrummet fra i til j

▼M7

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig vækst-hastighed samt estimater for variansen.

51. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed bør beregnes for hele testperioden (tiden »i« i ovenstående formel er testens starttid, og tiden »j« er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimater for variansen. Derudover bør der foretages en trinvis beregning af væksthastigheden for at vurdere testkemikaliets virkninger i eksponeringsperioden (f.eks. ved betragtning af logaritmisk transformerede vækstkurver).

52. Hæmningen i procent af væksthastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

hvor:

% Ir er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μC er gennemsnitsværdien af μ i kontrolgruppen

μT er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen

Udbytte

53. Virkningerne på udbyttet bestemmes på grundlag af målevariablen længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) i hver testbeholder ved testens start og slutning. For frisk- eller tørvægten bestemmes startbiomassen på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pode testbeholderne. For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent (% I_y) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

hvor:

% Iy er udbyttereduktionen i procent

bC er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen

bT er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen

Fordoblingstid

54. Til bestemmelse af fordoblingstiden (T_d) for længden af hovedskuddet og overensstemmelse med dette validitetskriterium (jf. punkt 8) anvendes følgende formel på de data, der er indsamlet for kontrolbeholderne:

$T_d = \ln 2/\mu$

hvor μ er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, der bestemmes som beskrevet i punkt 50-52.

▼M7

Optegning af koncentration/respons-kurver

55. Der bør afsættes koncentration/respons-kurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_r eller I_y, beregnet som vist i punkt 53) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

56. Estimaterne for EC_x bør baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed (E_rC_x), dels af udbytte (E_yC_x), der hver især bør baseres på længden af hovedskud og eventuel yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse). Dette skyldes, at der findes kemikalier med virkning på længden af hovedskuddet og på de øvrige målevariable. Som parametre for toksicitet er der derfor fire EC_x-værdier for hvert beregnet hæmningsniveau x: E_rC_x (længde af hovedskud), E_rC_x (dvs. helst den samlede længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse), E_yC_x (længde af hovedskud) og E_yC_x (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse).

57. Det bør bemærkes, at EC_X-værdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og denne forskel haves for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (E_rC_x) vil i de fleste tilfælde være højere end resultater baseret på udbytte (E_yC_x), når testbetingelserne i denne forsøgsmetode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Denne forskel bør ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser.

Statistiske metoder

58. Målet er at formulere en kvantitativ koncentrations/respons-sammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — f.eks. med probit-, logit- eller Weibull-modeller (7), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret af transformationen og derved forstyrre analysen (7). Det bør bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og bør modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller udbytte. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x-værdier ud fra kontinuerlige data findes i henvisning (8) (9) (10).

59. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations/respons-forholdet til at beregne punktestimater for EC_x-værdier. Når det er muligt, bør der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes grad af egnethed til regressionsmodellen bør vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen bør foretages ud fra responsværdierne for de enkelte replikater, ikke gruppegennemsnit.

60. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (10).

61. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan eventuelt bruges (12) (13) (14) (15) (16). Det skal vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (15). Hertil kan Levenes eller Bartletts test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er

▼M7

ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, bør analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Der er supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC i (10).

62. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater for EC_x. Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne *Myriophyllum*test. Et område på 10 til 20 % synes imidlertid at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det bør foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20} og deres konfidensgrænser.

Rapportering

63. Testrapporten indeholder følgende:

Testkemikalie

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer eller blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter

— Videnskabeligt navn og kilde

Testbetingelser

— Den anvendte forsøgsmetode (statisk, eller semistatisk).

— Startdato og varighed for testen.

— Testmedium.

— Beskrivelse af testens design: testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, længden af hovedskud pr. testbeholder ved testens start.

— Testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration.

— Metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler.

— Testtemperaturen.

— Lyskilde, lysintensitet og -homogenitet.

— PH-værdierne af test- og kontrolmedierne.

— Analysemetoder for testkemikaliet med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne).

▼M7

— Metoder til bestemmelse af længden af hovedskud og andre målevariable, f.eks. samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.

— Kulturen (steril eller ikke-steril) i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation.

— Alle fravigelser fra denne forsøgsmetode.

Resultater

— Rådata: længden af hovedskud og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse.

— Gennemsnit og standardafvigelse for hver målevariabel.

— Vækstkurver for hver målevariabel.

— Beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne.

— Grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning.

— Estimater for toksicitetsendepunkter for responsvariablene, f.eks. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem.

— Hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel).

— Enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling.

— Ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne.

— Diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne.

LITTERATUR

1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

3) Kapitel C.26 i dette bilag*: Lemna sp. Vækshæmningstest.*

4) OECD (2014), »*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

5) OECD (2000), »Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

6) *Kapitel C.51 i dette bilag*: Toksicitetstest af vandsedimentet myriophyllum spicatum.

▼**M7**

7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

10) OECD (2006), »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Tillæg 1

DEFINITIONER

Biomasse: frisk- og/eller tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test er biomasse summen af hovedskud, alle sidegrene og alle rødder.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Chlorose: farveændringen fra grøn til gul i testorganismen, især i grenkranse.

Ecx: den koncentration af testkemikaliet, som er opløst i testmediet, der resulterer i en reduktion på x % (f.eks. 50 %) i væksten i *Myriophyllum spicatum* inden for en fastlagt eksponeringstid (som udtrykkeligt skal angives, hvis den adskiller sig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis vækshastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for vækshastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. E_rC (længde af hovedskud).

Vækst: stigning i målevariablen, f.eks. længde af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse i testperioden.

Vækshastighed (gennemsnitlig specifik vækshastighed): den logaritmiske forøgelse i målevariablen i eksponeringsperioden. *Bemærk:* Vækshastighedsrelaterede responsvariable er uafhængige af testens varighed, så længe vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariable: enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. Målevariable i denne forsøgsmetode er længden af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse.

Monokultur: en kultur med en planteart.

Nekrose: dødt (dvs. hvidt eller mørkebrunt) væv fra testorganismen.

Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC): testkoncentrationen lige under LOEC.

▼M7

Responsvariabel: en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målevariable, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende forsøgsmetode er væksthastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som længde af hovedskud, samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.

Semistatisk test (udskiftningstest): en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test: en forsøgsmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne forsøgsmetode.

Endepunkt for en test: den generelle faktor, som testkemikaliet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne forsøgsmetode er endepunktet vækstthæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testmedium: det komplette, syntetiske næringsmedium, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testmediet.

UVCB: et stof med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Udbytte: værdien af en målevariabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start. Bemærkning: Når vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel, falder udbyttebaserede responsvariable med testperioden.

▼M7

Tillæg 2

MODIFICERET ANDREWS-MEDIUM TIL STAMKULTUR OG PRÆKULTUR

Det modificerede Andrews-medium, som skal bruges til stamkulturen og prækulturen, fremstilles af fem særskilt fremstillede næringsstamopløsninger tilsat 3 % saccharose.

Tabel 1

Sammensætning af Andrews-næringsopløsning: (ASTM-betegnelse E 1913-04)

Fremstilling af stamopløsninger af næringsstoffer			Fremstilling af næringsopløsninger
Stamopløsning	Kemikalie	Startvægt pr. 1 000 ml	Ml pr. 5 l næringsopløsning
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$(Ca(NO_3)_2 * 4 H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 *7 H_2O$	9,86 g	50
3	Se nedenstående stamopløsning 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 * 7 H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA* 2 H_2O$	0,372 g	

Stamopløsninger kan opbevares i køleskab i seks måneder (ved 5-10 °C). Kun stamopløsning nr. 5 har en begrænset holdbarhed (to måneder).

Tabel 2

Fremstilling af stamopløsning 3.1 til fremstilling af stamopløsning 3

Kemikalie	Startvægt g/100 ml
$MnSO_4 \times 4 H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$	0,0037

Efter at have fremstillet stamopløsning 3.1 (tabel 2) fryses denne opløsning i ca. 11 ml-aliquoter (ved mindst – 18 °C). De frosne portioner har en holdbarhed på fem år.

For at fremstille stamopløsning 3: Optø stamopløsning 3.1, fyld 10 ml i en 1-liters målekolbe, og tilsæt ultrarent vand op til kolbens markering.

For at få modificeret Andrews-medium: Fyld ca. 2 500 ml ultrarent vand i en 5-litersmålekolbe. Tilsæt 50 ml af hver stamopløsning, og fyld derefter 90 % af målekolben med ultrarent vand og indstil pH-værdien til 5,8.

▼M7

Tilsæt derefter 150 g opløst saccharose (3 % pr. 5 l), og fyld målekolben med ultrarent vand op til markeringen. Fyld til sidst næringsopløsningen i 1-liters Schott-kolber, og autoklaver ved 121 °C i 20 minutter.

Den udledte næringsopløsning kan holdes steril i køleskab (ved 5-10 °C) i tre måneder.

Modificeret Andrews-medium til sedimentfri toksicitetstest

Ud af de fem stamopløsninger med næringsstoffer, som allerede er nævnt i tabel 1 og 2, fremstilles 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium, som skal bruges til at opnå testopløsningerne, tilsat 30 % saccharose. For at gøre dette: Fyld ca. 100 ml ultrarent vand i en 1-litersmålekolbe. Tilsæt 100 ml af hver af stamopløsningerne, og indstil pH-værdien til 5,8. Tilsæt derefter 30 % opløst saccharose (300 g pr. 1 000 ml), og fyld målekolben med ultrarent vand op til markeringen.

Fyld til sidst næringsopløsningen i 0,5-liters Schott-kolber, og autoklaver ved 121 °C i 20 minutter.

Den udledte 10-fold koncentrerede næringsopløsning kan holdes steril i køleskab (ved 5-10 °C) i tre måneder.

▼M7

Tillæg 3

VEDLIGEHOLDELSE AF STAMKULTUREN

I dette tillæg 3 beskrives stamkulturen for *Myriophyllum spicatum* L ([1]), en tokimbladet undervandsplante, som er en art i tusindbladsfamilien. Mellem juni og august stikker diskrete rosa-hvide blomster op over vandoverfladen. Planternes rødder er et system af robuste jordstængler og findes på hele den nordlige halvkugle i eutrofisk, men ikke forurenet og mere kalkholdigt stille vand med mudret underlag. *Myriophyllum spicatum* foretrækker ferskvand, men findes også i brakvand.

Til sedimentfri stamkultur under laboratorieforhold skal der anvendes sterile planter. Sterile planter fås fra det økotoksikologiske laboratorium i den tyske Umweltbundesamt (den tyske miljøstyrelse).

Alternativt kan testorganismer fremstilles af ikke-sterile planter i overensstemmelse med ASTM-betegnelse E 1913-04. Se nedenfor — hentet fra ASTM Standard Guide — proceduren for dyrkning af *Myriophyllum sibiricum* indsamlet i felten:

»Hvis udgangspunktet er ikke-sterile planter indsamlet i felten, indsamles skud fra *M. sibiricum* i efteråret. Anbring skuddene i et 20-liters akvarium med 5 cm sterilt sediment som er dækket af kvartssand eller f.eks. af Turface® og 18 l reagensvand. Beluft akvariet, og hold en temperatur på 15 °C og en fluenshastighed på 200 til 300 μmol m^{-2} s^{-1} i 16 timer pr. dag. Plantekulturen i akvariet kan opretholdes som backup for planterne, hvis de sterile plantekulturer ødelægges ved en mekanisk fejl i vækstkammeret, forurening eller anden årsag. De planter, der dyrkes i akvariet, er ikke sterile, og sterile kulturer kan ikke vedligeholdes i et batchdyrkningssystem. For at sterilisere kulturen fjernes planterne fra akvariet og skylles under rindende deioniseret vand i ca. 0,5 timer. Under aseptiske forhold i et laminar airflow-kammer desinficeres planterne i mindre end 20 minutter (indtil det meste plantevæv er bleget, og kun det voksende toppunkt stadig er grønt) i en 3 % (vægt/volumen) natriumhypochloritopløsning indeholdende 0,01 % af et passende overfladeaktivt stof. Omrør desinfektionsmiddel og plantemateriale. Segmenter med flere knuder overføres til sterile dyrkningsrør indeholdende 45 ml steriliseret modificeret Andrews-medium og med almindelige lukninger til dyrkningsrør. Der anbringes kun et plantesegment i hver testbeholder. Laboratoriets tætningsfilm anvendes til at fastgøre lukningen til dyrkningsbeholderen. Når der er etableret en steril kultur, bør der overføres plantesegmenter indeholdende flere knuder til nye testbeholdere med friske flydende næringsmedier hver 10 til tolv dage. Som påvist ved dyrkning på agarplader skal planterne være sterile og forblive sterile i otte uger, inden test kan iværksættes.«

Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (som stimulerer væksten af svampe og bakterier), skal alle materialer, opløsninger og kulturer fremstilles under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft (210 °C) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved 121 °C. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

Ved reduceret belysning og lavere temperatur (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) kan stamkulturer holdes i længere tid uden at skulle gendannes. Næringsmediet til

([1]) Carl von Linné (* 23. maj 1707 i Råshult /Älmhult; † 10. Januar 1778 i Uppsala).

▼M7

Myriophyllum bør være det samme som det, der anvendes ved test, men andre næringsrige medier kan anvendes til stamkulturer.

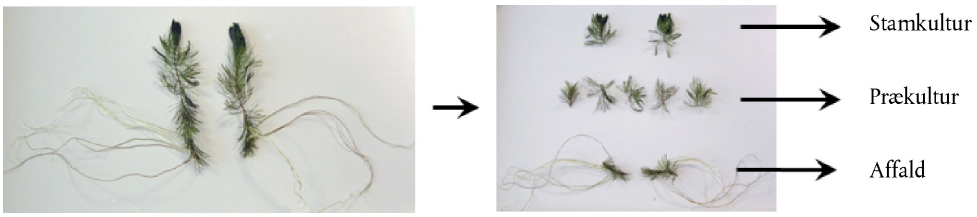
Plantesegmenterne fordeles axenisk i flere 500-ml-Erlenmeyer- og/eller 2 000-ml-Fernbach-kolber fyldt med henholdsvis ca. 450 eller 1 000 ml modificeret Andrews-medium. Derefter tilproppes kolberne axenisk med en celluloseprop.

Desuden er det nødvendigt at foretage en grundig flammebehandling af udstyret ved den sterile arbejdsbænk umiddelbart før brug. Afhængigt af antal og størrelse overføres planterne til frisk næringsopløsning ca. hver tredje uge.

Toppen samt segmenter af stammens midterste del kan anvendes til denne nye kultur. Antal og størrelse af de overførte planter (eller plantesegmenter) afhænger af, hvor mange planter der skal bruges. Der kan f.eks. overføres fem skudsegmenter i en Fernbach-kolbe, og tre skudsegmenter i en Erlenmeyer-kolbe, hver med en længde på 5 cm. Kasser alle rødder samt blomstrende, døde eller andre iøjnefaldende dele.

Figur 1

Beskæring af planter til stam- og prækultur efter tre ugers dyrkning.



Dyrkning af planter skal udføres i 500-ml-Erlenmeyer- og 2 000-ml-Fernbach-kolber i en køleinkubator ved 20 ± 2 °C med konstant lys på ca. 100-150 µE m^{-2} s^{-1} eller 6 000-9 000 lux (udsendt af belysning med farvetemperaturen »varmt hvidt lys«).

Figur 2

Dyrkning af planter i en køleinkubator med kammerbelysning.



Der bør anvendes kemisk rene (syrevaskede) og sterile dyrkningsbeholdere af glas samt aseptisk håndtering. I tilfælde af kontaminering af stamkulturen med f.eks. alger, svampe og/eller bakterier bør der fremstilles en ny kultur eller anvendes en stamkultur fra et andet laboratorium til fornyelse af denne kultur.

▼M7

Tillæg 4

VEDLIGEHOLDELSE AF PRÆKULTUR OG FREMSTILLING AF TESTORGANISME TIL TEST

For at fremstille en prækultur skæres skud af stamkulturen i segmenter med to grenkranse hver. Segmenterne lægges i Fernbach-kolber fyldt med modificeret Andrews-medium (tilsat 3 % saccharose). Hver kolbe kan indeholde op til 50 skudsegmenter. Det skal imidlertid sikres, at segmenterne er vitale og ikke har nogen rødder, sidegrene eller knopper (jf. fig. 1 i tillæg 3).

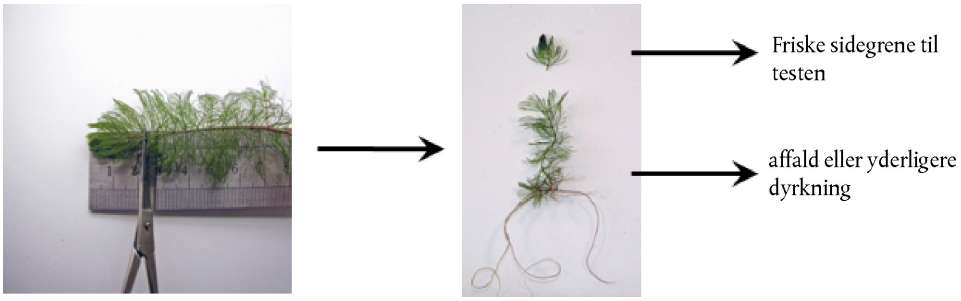
Prækulturens organismer dyrkes i 14 til 21 dage under sterile forhold i et konditioneringsrum med vekslende lyse og mørke perioder i intervaller af 16/8 timer. Lysintensiteten vælges i området 100-150 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$. Temperaturen i testbeholderne bør være 23 ± 2 °C.

Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (som stimulerer væksten af alger, svampe og bakterier), bør testkemikalieopløsningen fremstilles og dyrkes under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft (210 °C) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved 121 °C. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

Skud fjernes axenisk fra prækulturkolberne, idet der vælges så homogent et materiale som muligt. Hver test kræver mindst 60 testorganismer (test med otte testkemikaliekoncentrationer). Til testen anvendes friske sidegrene fra prækulturer, der afkortes til 2,5 cm fra roden (målt med lineal) og overføres til et bægerglas med sterilt modificeret Andrews-medium. Disse friske sidegrene kan anvendes til sedimentfri toksicitetstest af *Myriophyllum spicatum*.

Figur 2

Opskæring af planter fra prækulturen til den sedimentfri toksicitetstest af *Myriophyllum spicatum*.



▼M7

C.51. TOKSICITETSTEST AF VANDSEDIMENTET *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 239 (2014). Der findes forsøgsmetoder for den flydende, enkimbladede vandplante af arten *Lemna* (1) og for algearter (2). Disse metoder anvendes rutinemæssigt til at generere data til at vurdere risikoen ved testkemikalier, især kemikalier med herbicid aktivitet, for vandplantearter, der ikke er målarter. I nogle tilfælde kan der imidlertid være behov for oplysninger om yderligere makrofytarter. Den seneste vejledning offentliggjort af workshoppen i Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) om risikovurdering af akvatiske makrofyter for pesticider (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides (AMRAP)) viste, at der kan være behov for data om makrofytarter med rod for testkemikalier, hvor *Lemna* og alger er kendt for ikke at være følsomme over for virkningsmekanismen, eller hvis separation til sediment er et problem, der fører til eksponering via rodoptagelse (3). Baseret på vores nuværende viden og erfaring blev *Myriophyllum* spp valgt som den foretrukne art i de tilfælde, hvor der er behov for data om en tokimbladet undervandsart med rod (4) (5) (6). Denne test erstatter ikke andre akvatiske toksicitetstest, men bør derimod supplere dem, så der kan foretages en mere fuldstændig fare- og risikovurdering af vandplanter. Forsøgsmetoden for vandsedimenter *Myriophyllum spicatum* supplerer den sedimentfri toksicitetstest for *Myriophyllum spicatum* (7).

2. Dette dokument beskriver en forsøgsmetode, som giver mulighed for at vurdere virkningerne af et testkemikalie på vandplantearten *Myriophyllum spicatum*, som har rødder, og som vokser i et vandsedimentsystem. Forsøgsmetoden er til dels baseret på eksisterende metoder (1) (2) (8) og tager højde for den seneste forskning i forbindelse med risikovurderingen af vandplanter (3). Vandsedimentmetoden er blevet valideret af en international ringtest med *Myriophyllum*-arter, der er blevet dyrket under statiske forhold, og som blev eksponeret for testkemikaliet, der blev tilført via vandsøjlen (9). Testsystemet kan dog nemt tilpasses, så det giver mulighed for eksponering via spiket sediment eller eksponering via vandfasen i semistatiske scenarier eller scenarier med pulserende dosis, selv om disse scenarier ikke har undergået en formel ringtest. Endvidere kan den generelle metode anvendes til andre vandarter og fremspirende arter med rod, herunder andre arter af *Myriophyllum* (f.eks. *Myriophyllum aquaticum*) og *Glyceria maksima* (10). Det kan være nødvendigt at foretage ændringer i testbetingelser, design og varighed for alternative arter. Der er navnlig behov for ekstraarbejde i forbindelse med fastlæggelse af hensigtsmæssige procedurer for *Myriophyllum aquaticum*. Disse muligheder er ikke belyst i denne forsøgsmetode, som beskriver standardmetoden til eksponering af *Myriophyllum spicatum* i et statisk system via vandfasen.

3. Denne forsøgsmetode gælder for stoffer, som forsøgsmetoden er valideret for (se nærmere oplysninger i ringtestrapporten (9)), eller formuleringer eller kendte blandinger. Der kan foretages en *Myriophyllum*-test for at opfylde kravet om tier-1-data udløst af eventuel separation af testkemikaliet til sediment eller spørgsmål om virkningsmekanisme/selektivitet. Ligeledes kan der være behov for en laboratoriebaseret *Myriophyllum*-test som led i en højere tier-strategi, der skal imødekomme bekymringer om risikoen for vandplanter. Den specifikke grund til at foretage en test bestemmer eksponeringsvejen (dvs. via vand eller sediment). Før forsøgsmetoden anvendes til en lovmæssig test af en blanding, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

▼M7

PRINCIP FOR TESTEN

4. Testen er udviklet til at vurdere kemiske virkninger på den vegetative vækst af *Myriophyllum*-planter, der dyrkes i standardiserede medier (vand, sediment og næringsstoffer). Af denne grund dyrkes topskud af sunde, ikke-blomstrende planter i standardiseret, kunstigt sediment, som tilsættes yderligere næringsstoffer for at sikre, at planten vokser tilstrækkeligt, og derefter vedligeholdes de i Smart and Barko-medium (tillæg 1). Efter en etableringsperiode, hvor roden dannes, eksponeres planterne for en række testkoncentrationer, der tilsættes vandsøjlen. Alternativt kan eksponering via sediment simuleres ved at spike det kunstige sediment med testkemikaliet og transplantere planterne til dette spikede sediment. I begge tilfælde vedligeholdes planterne derefter i et kontrolleret miljø i 14 dage. Virkningen på væksten bestemmes ud fra kvantitative vurderinger af skuddenes længde, friskvægt og tørvægt samt kvalitative observationer af symptomer såsom chlorose, nekrose eller vækstdeformiteter.

5. De kemikalierelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrolplanterne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % af væksthastigheden, og som betegnes EC_x; »x« kan være en vilkårlig værdi afhængigt af lovkravene, f.eks. EC_{10}, EC_{20} og EC_{50}. Det bør bemærkes, at estimater af EC_{10}- og EC_{20}-værdier kun er pålidelige og relevante i test, hvor variationskoefficienterne i kontrolplanterne falder til under det anslåede effektniveau, dvs. variationskoefficienterne bør være < 20 % for at give et robust skøn af EC_{20}.

6. Både den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (anslået ud fra vurderinger af længden af skuddene, skuddenes friskvægt og tørvægt) og udbytte (anslået ud fra den øgede længde af skuddene, skuddenes friskvægt og skuddenes tørvægt) af ubehandlede og behandlede planter bør bestemmes. Den specifikke væksthastighed (r) og udbyttet (y) anvendes efterfølgende til at bestemme henholdsvis E_rC_x (f.eks. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) og E_yC_x (f.eks. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Om nødvendigt kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk ud fra vurderinger af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed og udbyttet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Der bør foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testmediet.

9. Af oplysninger om testkemikaliet, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, sammensætning i tilfælde af stoffer med flere bestanddele, UVCB'er, blandinger eller formuleringer, renhed, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, syrestyrkekonstant (pK_a) fordelingskoefficient octanol/vand (K_{ow}), hvis der findes K_d for sedimenter, damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikalie i løbet af testperioden. Hvis der sandsynligvis kan forventes tab af kemikalier, bør tabene kvantificeres, og de efterfølgende trin til at kontrollere sådanne tab bør dokumenteres. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse egenskaber under testbetingelserne, dvs. med samme næringsmedium, temperatur og belysning som i testen. *Bemærk*: Ved test af lysafhængige peroxiderende herbicider bør laboratorielyset indeholde den forekomst af ultraviolet lys, som findes i naturligt sollys.

▼M7

10. pH-værdien bør måles og justeres i testmediet, hvor det er relevant. Kontrollen af testmediets pH-værdi er særlig vigtig, f.eks. ved test af metaller eller kemikalier, som er hydrolytisk ustabile. I OECD's vejledning (11) findes der yderligere vejledning i test af kemikalier, hvis fysisk-kemiske egenskaber vanskeliggør testen (11).

TESTENS GYLDIGHED

11. For at testresultaterne er gyldige, skal den gennemsnitlige samlede længde af skuddene og den gennemsnitlige samlede friskvægt af skuddene hos kontrolplanterne som minimum fordobles i testens eksponeringsfase. Desuden må kontrolplanterne ikke vise synlige symptomer på chlorose og bør være synligt fri for forurening fra andre organismer såsom alger og/eller bakteriel film på planterne, på overfladen af sedimentet og i testmediet.

12. Den gennemsnitlige variationskoefficient for udbytte baseret på målinger af vægten af friske skud (dvs. fra testen påbegyndes, til den afsluttes) i kontrolkulturerne må ikke overstige 35 % mellem replikaterne.

REFERENCEKEMIKALIE

13. Et referencekemikalie, f.eks. 3,5-dichlorphenol, der anvendes i ringtesten (9), bør testes løbende for at kontrollere testprocedurens resultater over tid. Data fra ringtesten viser, at de gennemsnitlige EC_{50}-værdier for 3,5-DCP for de forskellige responsvariable lå på mellem 4,7 og 6,1 mg/l (se ringtestrapporten for nærmere detaljer om det forventede konfidensinterval omkring disse værdier). Det tilrådes, at test af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testfrekvensen er ujævn, sideløbende med den endelige toksicitetstest. Der findes en vejledning til forventede EC_{50}-værdier for 3,5-DCP i den statistiske rapport om internationale ringtest (9).

BESKRIVELSE AF METODEN

Testapparatur

14. Testen bør udføres under kontrollerede forhold, dvs. i et vækstkammer, vækstrum eller laboratorium, med kontrollerbar dagslængde, belysning og temperatur (jf. afsnittet »Testbetingelser«, punkt 56-58). Stamkulturer bør holdes adskilt fra testbeholderne.

15. Undersøgelsen bør udføres ved hjælp af testbeholderne af glas, f.eks. akvarier eller bægerglas; der anvendes almindeligvis 2-liters bægerglas (ca. 24 cm høje og 11 cm i diameter). Andre (dvs. større) beholdere kan være egnede under forudsætning af, at der er tilstrækkelig vanddybde til ubegrænset vækst og til at holde planterne nedsænket i hele testperioden.

16. Plast- eller glaskrukker (ca. 9 cm i diameter og 8 cm høje og rumfang på 500 ml) kan anvendes som beholdere til udplantning af planterne i sedimentet. Alternativt kan der anvendes bægerglas, og disse foretrækkes i nogle tilfælde (f.eks. til test af hydrofobe kemikalier eller kemikalier med høj K_{ow}).

17. Størrelsen af krukken/bægerglasset skal tages i betragtning sammen med valget af testbeholder og det foretrukne testdesign (jf. nedenfor). Hvis testdesign A anvendes (et skud pr. krukke med tre krukker pr. beholder), kan det være nødvendigt at anvende mindre krukker eller større beholdere. Hvis testdesign B anvendes (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder), bør den anførte størrelse krukke og beholder være tilstrækkelig. Under alle omstændigheder bør der være en vanddybde på mindst 12 overskydende cm over sedimentets overflade, og forholdet mellem sedimentets overfladeareal/rumfang og vandoverfladeareal/rumfang bør registreres.

▼M7

Testorganisme

18. Den generelle tilgang beskrevet i denne forsøgsmetode kan anvendes til at teste en række vandplantearter. De betingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode, er imidlertid tilpasset test af arter af tusindbladsfamilien, *Myriophyllum spicatum*. Denne art tilhører den tokimbladede familie, Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (eurasisk tusindblad) er en undervandsart med rødder, som tåler en lang række forhold og findes i både statisk og strømmende vand. *M. spicatum* er en flerårig plante, der dør tilbage til rødderne i vintermånederne. Planterne blomstrer normalt frit og sætter frø frit, selv om vegetativ formering fra skud eller stammefragmenter, der løsriver sig naturligt eller efter forstyrrelser, ofte er den primære koloniseringsmetode.

Dyrkning af testorganismen

20. Planter kan fås fra naturlige populationer eller via leverandører af vandplanter. I begge tilfælde bør kilden til planterne dokumenteres, og arternes identitet bør kontrolleres. Der bør udvises stor forsigtighed for at sikre, at der indsamles de korrekte arter af *Myriophyllum spicatum* i felten, især i områder, hvor den kan hybridiseres med andre *Myriophyllum*-arter. I tvivlstilfælde anbefales det at anvende verificerede laboratoriekulturer fra kendte kilder. Planter, der har været eksponeret for kemiske forurenende stoffer eller er indsamlet fra lokaliteter, der vides at være kontaminerede, bør ikke benyttes i denne test.

21. I regioner, hvor *M. spicatum* ikke umiddelbart er tilgængelig i vintermånederne, kan det være nødvendigt at vedligeholde stamkulturer på lang sigt i et drivhus eller under laboratorieforhold. Stamkulturer bør vedligeholdes under samme forhold som testbetingelser, selv om bestråling og temperatur kan nedsættes med henblik på at reducere hyppigheden af kulturvedligeholdelse (f.eks. når der ikke er planlagt test af *Myriophyllum* i en periode). Det anbefales at bruge større akvarier og plantekrukker, end der ville blive brugt i test, for at give plads til spredning. Sammensætningen af sediment og vandmedier bør være den samme som i test, selv om der kan anvendes alternative metoder til sedimentgødning (f.eks. brug af kommercielle gødningsformuleringer med langsom frigivelse).

22. Stamplanter bør være synligt fri for forurening med andre organismer, herunder snegle, trådalger, svampe og insekter, f.eks. æg eller larver af *Paraponyx stratiotata*-møl og larver eller voksne snudebiller, curculionidae, af arten *Eubrychius velutus*. Det kan være nødvendigt at skylle plantemateriale i ferskvand for at fjerne synlig forurening. Desuden bør der gøres en indsats for at minimere udviklingen af kontaminering med encellede alger og bakterier, om end det ikke er nødvendigt med fuldstændig sterilt plantemateriale. Stamkulturerne bør overvåges og om nødvendigt transplanteres for at undgå kontaminering med alger og bakterier. Stamkulturer kan med fordel beluftes, såfremt kontaminering med alger eller bakterier bliver et problem.

23. I alle tilfælde dyrkes/akklimatiseres planter under forhold, der ligner, men ikke nødvendigvis er identiske med de forhold, der anvendes i testen i en passende periode (dvs. > 2 uger), før de anvendes i en test.

24. Blomstrende stamkulturer bør ikke anvendes i en test, da den vegetative vækst generelt falder under og efter blomstring.

▼M7

Sediment

25. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på det syntetiske sediment, der anvendes i kapitel C.28 i dette bilag (8), i denne test. Sedimentet fremstilles som beskrevet i TM C.28, idet der dog tilsættes nedenstående næringsstoffer:

a) 4-5 % tørv (tørvægt, i henhold til 2 ± 0,5 % organisk kulstof) så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt. Det er vigtigt at bruge tørv i form af pulver, fint formalet (helst partikelstørrelse på < 1 mm) og kun lufttørret.

b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit.

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm).

d) Et vandigt næringsmedie tilsættes således, at det endelige sedimentparti indeholder 200 mg/kg tørt sediment af både ammoniumchlorid og natriumphosphat, og vandindholdet i den færdige blanding ligger på 30-50 %.

e) Kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5.

26. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand bør være kendt og dokumenteret. Hvis oprindelsen er ukendt eller giver anledning til bekymring, bør det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.).

27. De tørre bestanddele i sedimentet skal blandes homogent, inden den vandige næringsopløsning blandes grundigt i sedimentet. Det fugtige sediment skal fremstilles mindst to dage før brug, så tørven kan gennemvædes, og for at forhindre, at hydrofobe tørvepartikler flyder op til overfladen, når sedimentet dækkes med medie. Inden brug kan det fugtige sediment opbevares i mørke.

28. Ved testen overføres sedimentet til beholdere af en passende størrelse såsom plantekrukker med en diameter, som passer ind i glasbeholderne (sedimentets overflade skal dække ca. 70 % eller mere af beholderens overflade). Såfremt beholderen har huller i bunden, vil et stykke filtrerpapir i bunden af beholderen hjælpe med at holde sedimentet i beholderen. Krukkerne fyldes med sedimentet således, at sedimentets overflade er jævn, inden det dækkes med et tyndt lag (~ 2 til 3 mm) af et inert materiale som f.eks. sand eller fint havegrus (eller knust koral) for at holde sedimentet på plads.

Testmedium

29. Smart and Barko-medium (12) anbefales til dyrkning og test af *Myriophyllum spicatum*. Dette medie fremstilles som beskrevet i tillæg 1. Mediets pH-værdi (vandfase) ved testens påbegyndelse skal være mellem 7,5 og 8,0 for optimal plantevækst.

Testdesign

30. Testen bør omfatte mindst seks replikate testbeholdere til den ubehandlede kontrolgruppe og mindst fire replikate testbeholdere for hver af mindst fem koncentrationer.

31. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration.

▼M7

32. Hver testbeholder svarer til et replikat med tre skud. Der er to muligheder for at dyrke tre skud i hver testbeholder:

— Testdesign A: et skud pr. krukke og tre krukker pr. beholder.

— Testdesign B: tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder.

— Alternative testdesign af et skud pr. krukke pr. testbeholder kan accepteres, forudsat at replikationen justeres som krævet for at opnå de krævede validitetskriterier.

33. De enkelte testbeholdere randomiseres til behandlingsgrupperne. Testbeholdernes placering i testområdet skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur.

Koncentrationer af testkemikalie og kontrolgrupper

34. Koncentrationer bør normalt følge en kvotientrække med en foretrukken kvotient mellem testkoncentrationerne på højst 3,2. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til testkemikaliets toksicitet fra en test til bestemmelse af dosisinterval.

35. Ved bestemmelse af en EC_x-værdi skal denne ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den skal blive bestemt med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC_{50}-værdi bør den højeste testkoncentration således være større end EC_{50}-værdien. Ligger EC_{50}-værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit. Brug af flere testkoncentrationer vil forbedre konfidensintervallet omkring den resulterende EC_x-værdi.

36. For at bestemme LOEC/NOEC (valgfrit endepunkt) skal den laveste testkoncentration være tilstrækkeligt lav til, at væksten ikke er væsentligt forskellig fra væksten i kontrolplanterne. Desuden skal den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrolprøven. Brug af flere replikater vil øge den statistiske power af nuleffektkoncentrationen/ANOVA-designet.

Grænsetest

37. I de tilfælde, hvor en indledende test viser, at testkemikaliet er uden bivirkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over kemikaliets opløselighed i testmediet eller i tilfælde af en formulering op til grænsen af dens dispergeringsevne, kan der udføres en grænsetest for at gøre det lettere at sammenholde responsen i en kontrolgruppe med responsen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen eller 1000 mg/kg tørt sediment). Denne test bør følge de generelle principper for en standardtest med fast dosis med den undtagelse, at det tilrådes at øge det mindste antal replikater til seks testbeholdere pr. kontrol og koncentration. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

Testopløsninger

38. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning fremstillet ved opløsning eller dispergering af testkemikaliet i Smart and Barko-medium ved hjælp af demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand (jf. tillæg 1).

▼M7

39. Den højeste testkoncentration bør normalt ikke overstige testkemikaliets vandopløselighed eller, i tilfælde af formuleringer, dispergerbarheden under testbetingelserne.

40. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliet ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikalie til testmediet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne opløsnings- eller dispergeringsmidler bør så vidt muligt søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler bør ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration rapporteres og holdes på et minimum (≤ 100 µl/l). Under disse omstændigheder bør alle behandlinger og (opløsningsmiddel)kontroller indeholde den samme koncentration af opløsningsmiddel eller dispergeringsmiddel. Ubehandlede kontrolreplikater, som ikke indeholder et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, indarbejdes også i testdesignet. Nærmere anvisninger vedrørende brug af dispergeringsmidler kan findes i OECD vejledning (11).

TESTPROCEDURE

41. Forsøgsmetoden varierer i forhold til anvendelsen af testkemikaliet (dvs. via vand eller sediment). Testkemikaliets sandsynlige adfærd i et vandsedimentsystem bør overvejes for at kunne vælge den anvendte eksponering i testen (dvs. statisk eller statisk fornyelse, spiket vand eller spiket sediment). Spiket sediment kan i nogle tilfælde være at foretrække for kemikalier, der vil give en væsentlig fordeling til sediment.

Etableringsfase

42. Sunde skudspidser, dvs. uden sideskud, skæres af kulturplanterne for at få en skudlængde på 6 cm (± 1 cm). For testdesign A (et skud pr. krukke og tre krukker pr. beholder) plantes enkelte skudspidser i hver krukke. For testdesign B (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder) plantes fire til fem skudspidser i hver krukke med sediment.

43. I begge tilfælde bør overskydende krukker tilplantes for at give mulighed for at udvælge ensartede planter ved testens start og for at have ekstra planter til rådighed, som kan anvendes til at undersøge rodvæksten umiddelbart før behandling og til overskydende planter, der høstes til skudbiomasse og længdemålinger på dag 0.

44. Skud isættes således, at ca. tre cm, der dækker mindst to knuder, er under sedimentets overflade.

45. Krukkerne overføres derefter til testbeholdere under samme miljømæssige betingelser, som gælder for eksponeringsfasen, og vedligeholdes i syv dage i Smart and Barko-medium for at fremkalde rodudvikling.

46. Herefter bør flere planter i overskydende krukker fjernes med henblik på undersøgelse af rodvæksten. Hvis rodvæksten ikke er synlig (dvs. rodspidsen ikke er synlig), bør etableringsfasen forlænges, indtil rodvæksten er synlig. Dette trin anbefales for at sikre, at planterne vokser aktivt, når testen indledes.

▼M7

Udvælgelse af ensartet plantemateriale

47. For testdesign A (et skud pr. krukke og tre krukker pr. beholder) udvælges ensartede krukker, inden testen indledes. For testdesign B (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder) fjernes overskydende planter, så der er tre planter tilbage af ensartet størrelse og udseende.

Eksponering via vandfasen

48. Krukker, der er udvalgt for deres ensartethed, anbringes i testbeholderne som krævet med henblik på test. Smart and Barko-medium tilsættes derefter testbeholderne. Der bør udvises omhu for at undgå forstyrrelse af sedimentet. Med henblik herpå kan der tilføjes medium ved hjælp af en tragt eller en plastskive for at dække sedimentet, mens mediet hældes i testbeholderne, forudsat at skiven fjernes umiddelbart efter. Alternativt kan plantekrukkerne placeres i testbeholderne efter tilsætning af mediet. I begge tilfælde kan der anvendes friske medier ved begyndelsen af eksponeringen, hvis det er nødvendigt for at minimere den potentielle udvikling af alger og bakterier, eller for at give mulighed for at fremstille enkelte partier testopløsning på tværs af replikater.

49. Skuddenes længde over sedimentet måles enten før eller efter tilsætning af mediet.

50. Den relevante mængde af testkemikaliet kan tilsættes testmediet, inden det tilsættes testbeholderne. Alternativt kan testkemikaliet tilsættes mediet, efter det er blevet tilsat testbeholderne. I dette tilfælde bør det sikres, at testkemikaliet fordeles homogent i hele testsystemet uden at forstyrre sedimentet.

51. I alle tilfælde registreres testmediets udseende (f.eks. klart, grumset mv.) ved starten af testen.

Eksponering via sediment

52. Spiket sediment af den valgte koncentration fremstilles ved, at en opløsning af testkemikaliet tilsættes det friske sediment direkte. En stamopløsning af testkemikaliet opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis testkemikaliet er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med ca. 10 g fint kvartssand til et testglas. Opløsningsmidlet lades afdampe, hvorefter sandet blandes med den passende mængde sediment pr. testglas. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere testkemikaliet. Mængden/vægten af det sand, der spikes med testkemikaliet, bør tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment bør således fremstilles med mindre sand). Det bør sikres, at det testkemikalie, der tilsættes sedimentet, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet.

53. Det spikede sediment fyldes i krukkerne (som beskrevet ovenfor). Planter, der er udvalgt for ensartethed og et passende rodsystem, fjernes fra de krukker, som blev anvendt i etableringsfasen, og overføres til det spikede sediment som beskrevet ovenfor.

54. Krukkerne anbringes i testbeholderne som krævet med henblik på test. Smart and Barko-medium tilsættes derefter forsigtigt (dvs. ved hjælp af en tragt) for at undgå at forstyrre sedimentet. Skuddenes længde over sedimentet måles enten før eller efter tilsætning af mediet.

▼M7

Vedligeholdelse af vandstand gennem hele testperioden

55. Det endelige vandvolumen skal registreres, og vandstanden markeres på hver enkelt testbeholder. Hvis vandet fordamper under testen med mere end 10 %, bør vandstanden justeres med destilleret vand. Om nødvendigt kan bægerglas tildækkes løst med et gennemsigtigt låg, f.eks. af plast, for at mindske fordampning og kontaminering med algesporer.

Testbetingelser

56. Lysstofrør med varmt og/eller køligt hvidt lys anvendes til at give lys med en strålingsintensitet på omkring 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ målt som en fotosyntetisk aktiv stråling (400-700 nm) i vandoverfladen med et forhold mellem lys og mørke på 16:8 timer. Lysets strålingsintensitet over testområdet bør ikke afvige mere end ± 15 % fra den valgte strålingsintensitet.

57. Temperaturen i testbeholderne er 20 ± 2 °C.

58. Kontrolmediets pH-værdi bør højst stige med 1,5 enheder under testen. Dog vil en afvigelse på mere end 1,5 enhed ikke gøre testen ugyldig, når det kan vises, at de tidligere angivne validitetskriterier er opfyldt.

Testens varighed

59. Eksponeringsperioden er 14 dage.

Målinger og analytiske bestemmelser

60. Efter etableringsfasen og umiddelbart før behandling (dvs. på dag 0) høstes overskydende planter fra fem vilkårligt udvalgte krukker til designet med tre planter pr. krukke eller 15 krukker til designet med en plante pr. krukke, med henblik på vurdering af skuddenes længde samt frisk- og tørvægt som beskrevet nedenfor.

61. For planter overført til eksponeringsfasen foretages følgende vurderinger som vist i tabel 1:

— Vurderinger af hovedskuddenes længde, antal sideskud og længden af sideskud registreres som minimum ved afslutningen af eksponeringsperioden (f.eks. på dag 14).

— Visuelle vurderinger af plantesundheden registreres mindst tre gange i løbet af eksponeringsperioden (f.eks. på dag 0, 7 og 14).

— Vurderinger af skuddenes frisk- og tørvægt foretages ved testens afslutning (dvs. på dag 14).

62. Skuddenes længde bestemmes ved hjælp af en lineal. Antal og længde af eventuelle sideskud bør også måles.

63. Visuelle vurderinger af plantesundheden foretages ved at registrere planternes udseende og testmediets generelle tilstand. Observationer, der skal bemærkes, omfatter:

— Nekrose, chlorose eller anden misfarvning som f.eks. overdreven rødmen i forhold til kontrolplanterne.

— Udvikling af kontaminering med bakterier eller alger.

— Vækstabnormiteter som f.eks. nedsat vækst, ændret internodal længde, forvanskede skud/blade, spredning af sideskud, bladtab, tab af turgor og stammefragmentering.

▼M7

— Der foretages en visuel vurdering af rodens sundhed ved testens afslutning ved omhyggelig at vaske sediment af rødderne, så rodsystemet kan observeres. Den foreslåede skala for vurdering i forhold til kontrolplanterne er vist nedenfor:

1) manglende rødder

2) få rødder

3) moderat rodudvikling

4) meget god rodudvikling svarende til kontrolplanterne

64. Vurderinger af friskvægt foretages ved testens begyndelse og afslutning ved at skære skuddet ved sedimentet og derefter duppe det tørt inden vejningen. Det er vigtigt at fjerne sedimentpartikler, der sidder fast i bunden af skuddet. Skudmateriale anbringes derefter i et tørreskab ved ca. 60 °C og tørres til en konstant vægt, inden det vejes på ny, og tørvægten registreres.

65. Et resumé af de biologiske risikovurderinger, der som minimum kræves i testperioden, er anført i tabel 1.

Tabel 1

Behandlingsplan

Dag efter behandling (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Skudlængde, længde og antal af sideskud	Visuel bedømmelse af skud	Skuds frisk- og tørvægt Visuel bedømmelse af rødder	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: angiver, at en vurdering er påkrævet i disse tilfælde
—: angiver, at målinger ikke er påkrævet

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

66. Mindst en gang dagligt bør temperaturen af substratet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i klimakammeret, inkubatoren eller lokalet (eller kontinuerligt med en datalogger), måles.

67. pH-værdien og koncentrationen af opløst ilt i testmediet bør kontrolleres ved testens start, mindst en gang i løbet af undersøgelsen og ved afslutningen af undersøgelsen i alle replikate beholdere. I hvert enkelt tilfælde bør der foretages målinger på samme tidspunkt på dagen. Hvis der anvendes bulkopløsninger til at fremstille alle replikater for hver testkoncentration, er en enkelt måling af hver bulkopløsning tilstrækkelig på dag 0.

68. Strålingsintensiteten bør måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet på punkter svarende til vandoverfladeniveau. Målingerne bør foretages mindst en gang ved testens start eller i løbet af testen. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og

▼M7

under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevne.

Analytiske målinger af testkemikaliet

69. Den korrekte anvendelse af testkemikaliet bør understøttes af analytiske målinger af koncentration af testkemikaliet.

70. Der bør indsamles vandprøver til kemisk testanalyse kort efter starten af testen (dvs. på dagen for anvendelse af stabile testkemikalier eller en time efter anvendelsen af kemikalier, som ikke er stabile) og ved testens afslutning for samtlige testkoncentrationers vedkommende.

71. Koncentrationer i sediment og sedimentets porevand bør bestemmes ved starten og afslutningen af testen, som minimum i den højeste testkoncentration, medmindre testkemikalierne er kendt for at være stabile i vand (> 80 % af den nominelle værdi). Målinger i sediment og porevand er muligvis ikke nødvendige, hvis fordelingen af testkemikaliet mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i et vand- og sedimentforsøg under lignende betingelser (f.eks. forhold mellem vand og sediment, anvendelsesmetode og sedimenttype).

72. Udtagning af prøver af sediment ved testens start kan medføre forstyrrelser i testsystemet. Der kan derfor være behov for yderligere testbeholdere for at gøre det lettere at foretage analytiske bestemmelser ved testens begyndelse og afslutning. Tilsvarende gælder det, at hvis det skønnes, at der er behov for foreløbige vurderinger, dvs. på dag 7, og analyser kræver store prøver af sediment, som er svære at fjerne fra testsystemet, bør der foretages analyser ved hjælp af yderligere testbeholderne, der er behandlet på samme måde som dem, der anvendes til biologiske vurderinger.

73. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter anbefales for at isolere interstitielt vand. Hvis det påvises, at testkemikaliet ikke absorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, hvis prøvestørrelsen er for lille.

74. I semistatiske test (dvs. eksponering via vandfasen), hvor koncentrationen af det eller de relevante testkemikalier ikke ventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testperioden uden udskiftning af testopløsninger, bør der udtages prøver af brugte og frisk fremstillede testopløsninger til analyse af koncentrationen af testkemikaliet ved hver udskiftning.

75. I de tilfælde, hvor den målte startkoncentration af testkemikaliet ikke ligger inden for 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration.

76. I alle tilfælde behøver man kun at bestemme testkemikaliets koncentration i et af måleglassene i en flergangsbestemmelse for hver af testkoncentrationerne. Alternativt kan testopløsninger af alle replikater for hver koncentration samles med henblik på analyse.

77. Hvis det kan konstateres, at koncentrationen af testkemikaliet har været holdt inden for 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne og den efterfølgende udledning af endepunkter baseres på nominelle eller målte startværdier.

▼M7

78. I disse tilfælde bør effektkoncentrationer baseres på de nominelle eller målte vandkoncentrationer ved testens start.

79. Hvis der imidlertid er beviser for, at koncentrationen er faldet (dvs. ikke holdes inden for 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration i det behandlede kammer) under hele testen, bør analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller modeller, der beskriver faldet i koncentrationen af testkemikaliet i det behandlede kammer (11).

DATAVURDERING

80. I de tilfælde, hvor det er nødvendigt at anvende et opløsningsmiddel/dispergeringsmiddel, kan data fra opløsningsmiddelkontrol og ubehandlede kontroller samles med henblik på statistiske analyser, forudsat at responserne fra opløsningsmiddelkontrollen og den ubehandlet kontrol ikke er statistisk signifikant forskellige.

Responsvariable

81. Formålet med testen er at bestemme testkemikaliets virkning på testartens vegetative vækst ved hjælp af to responsvariable, nemlig den gennemsnitlige specifikke væksthastighed og udbyttet, som følger:

Gennemsnitlig specifik væksthastighed

82. Denne responsvariabel er baseret på ændringer i logaritmerne for den samlede længde af skuddene, den samlede friskvægt af skuddene og den samlede tørvægt af skuddene over tid i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Denne variabel beregnes for hver replikat af hver kontrol- og behandlingsgruppe. Den gennemsnitlige længde og vægt af de tre planter pr. testbeholder (replikat) og efterfølgende væksthastigheden for hver replikat, bør beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

hvor:

μ_{i-j}: er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

N_i: er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

N_j: er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

t: er tidsrummet fra i til j

83. Ud fra responsværdierne for de enkelte replikater bør der beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimater for variansen for hver behandlings- og kontrolgruppe.

84. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed bør beregnes for hele testperioden (tiden »i« i ovenstående formel er testens starttid, og tiden »j« er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimater for variansen.

▼M7

85. Hæmningen i procent af væksthastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

hvor:

% Ir: er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μC: er gennemsnitsværdien af μ i kontrolgruppen

μT: er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen

Udbytte

86. Denne responsvariabel er baseret på ændringer i den samlede længde af skuddene, den samlede friskvægt af skuddene og den samlede tørvægt af skuddene over tid i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Udbyttehæmningen i procent (% I_y) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

hvor:

% I_y: er udbyttereduktionen i procent

b_C: er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen

b_T: er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen

Optegning af koncentration/respons-kurver

87. Der bør afsættes koncentration/respons-kurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_r eller I_y, beregnet som vist ovenfor) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

88. Estimaterne for EC_x (f.eks. EC_{50}) bør baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed (E_rC_x), dels af udbytte (E_yC_x), der hver især bør baseres på den samlede friskvægt af skuddene, den samlede tørvægt af skuddene og den samlede længde af skuddene).

89. Det bør bemærkes, at EC_X-værdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og denne forskel haves for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (E_rC_x) vil i de fleste tilfælde være højere end resultater baseret på udbytte (E_yC_x), når testbetingelserne i denne forsøgsmetode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Denne forskel bør ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser.

Statistiske metoder

90. Målet er at formulere en kvantitativ koncentrations/respons-sammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene, til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (13), men det må foretrækkes at benytte

▼M7

ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (13). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og bør modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller udbytte. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x-værdier ud fra kontinuerlige data findes i henvisning (14) (15) (16) og (17).

91. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations/respons-forholdet til at beregne punktestimater for EC_x-værdier. Konfidensgrænsen på 95 % for hvert estimat bestemmes, og responsdataenes grad af egnethed til regressionsmodellen bør vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen bør foretages ud fra responsværdierne for de enkelte replikater, ikke gruppegennemsnit.

92. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (18).

93. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet forsøgsmetode (f.eks. Dunnetts eller Williams test) (19) (20) (21) (22). Det skal vurderes, om variansanalysens forudsætning om normal fordeling (ND) og varianshomogenitet (VH) er opfyldt. Denne vurdering bør foretages i en Shapiro-Wilks-test (ND) eller Levenes test (VH). Manglende opfyldelse af forudsætningen om ND og varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis varianshetерogenitet og/eller afvigelse fra ND er ekstrem og ikke kan korrigeres ved transformation, bør det overvejes at analysere ved hjælp af metoder som Bonferroni-Welch-t-test, step-down Jonkheere Terpstra test og Bonferroni-Median-test. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (16).

RAPPORTERING

94. Testrapporten indeholder følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— kendetegnet så vidt muligt ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter

— videnskabeligt navn og kilde

Testbetingelser

— varighed af og betingelser for etableringsfasen

— den anvendte forsøgsmetode (statisk, semistatisk, pulseret)

▼M7

— startdato og varighed for testen

— testmedium, dvs. sediment og flydende næringsmedium

— beskrivelse af testens design: vækstkammer/rum eller laboratorium, testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, længde og vægt af testplanter pr. testbeholder ved testens start, forholdet mellem sedimentets overflade og vandoverflade, forholdet mellem sediment og vandvolumen

— testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration

— metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler

— testtemperaturen

— lyskilde, strålingsintensitet ($\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$)

— pH-værdierne for test- og kontrolmedier samt testmediets udseende ved testens start og afslutning

— oxygenkoncentrationer

— analysemetoder med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne)

— metoder til bestemmelse af målevariable, f.eks. længde, tørvægt, friskvægt

— alle fravigelser fra denne forsøgsmetode.

Resultater

— rådata: skuddenes længde og skuddenes vægt for planter/krukker og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse i henhold til vurderingsplanen i tabel 1

— gennemsnit og standardafvigelser for hver målevariabel

— vækstkurver for hver koncentration

— fordoblingstid/vaksthastighed i kontrollen på grundlag af skuddenes længde og friskvægt, herunder variationskoefficienten for udbyttet af friskvægt

— beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne

— grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning

— estimater for toksicitetsendepunkter for responsvariable, f.eks. EC_{50}, med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der er anvendt til at beregne dem

— hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)

— enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling

▼M7

— ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne

LITTERATUR

1) Kapitel C.26 i dette bilag: Lemna sp. Væksthæmningstest.

2) Kapitel C.3 i dette bilag: Ferskvandsalger og cyanobakterier, vækshæmningstest.

3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 januar 2008.

4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

7) Kapitel C.50 i dette bilag: Toksicitetstest af sedimentfri myriophyllum spicatum

8) Kapitel C.28 i dette bilag: Toksicitetstest af sediment/vand på chironomider med spiket vand

9) Ratte, M., H. Ratte (2014), »Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.

11) OECD (2000), »Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

16) OECD (2006), »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application«, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Tillæg 1

SAMMENSÆTNING AF SMART AND BARKO-MEDIUM

Komponent	Mængde reagens tilsat vand (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (luftligevægt)	7,9

(*) demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand

▼M7

Tillæg 2

DEFINITIONER

Biomasse: frisk- og/eller tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test er biomasse summen af hovedskud, alle sidegrene og alle rødder.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Chlorose: farveændringen fra grøn til gul i testorganismen, især i grenkranse.

Ecx: den koncentration af testkemikaliet, som er opløst i testmediet, der resulterer i en reduktion på x % (f.eks. 50 %) i væksten i *Myriophyllum spicatum* inden for en fastlagt eksponeringstid (som udtrykkeligt skal angives, hvis den adskiller sig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis vækshastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for vækshastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. E_rC (længde af hovedskud).

Vækst: stigning i målevariablen, f.eks. længde af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse i testperioden.

Vækshastighed: (gennemsnitlig specifik vækshastighed): den logaritmiske forøgelse i målevariablen i eksponeringsperioden. *Bemærk*: Vækshastighedsrelaterede responsvariable er uafhængige af testens varighed, så længe vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariable: enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. Målevariable i denne forsøgsmetode er længden af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse.

Monokultur: en kultur med en planteart.

Nekrose: dødt (dvs. hvidt eller mørkebrunt) væv fra testorganismen.

Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC): testkoncentrationen lige under LOEC.

Responsvariabel: en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målevariable, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende forsøgsmetode er vækshastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som længde af hovedskud, samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.

Semistatisk test (udskiftningstest): en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test: en forsøgsmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

▼M7

Testkemikalie: er stoffer eller blandinger, der testes med denne forsøgsmetode.

Endepunkt for en test: den generelle faktor, som testkemikaliet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne forsøgsmetode er endepunktet vækshæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testmedium: det komplette, syntetiske næringsmedium, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testmediet.

UVCB: et stof med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Udbytte: værdien af en målevariabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start. Bemærk: Når vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel, falder udbyttebaserede responsvariable med testperioden.

▼M8

C.52. MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST (MEOGRT) (JAPANSK RISFISK UDVIDET ENKELTGENERATIONS REPRODUKTIONSTEST)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 240 (2015). Medaka Extended One Generation Test (MEOGRT) beskriver en detaljeret forsøgsmetode baseret på fisk, der er blevet eksponeret i flere generationer, for at finde frem til data, der er relevante for miljøtruslen og risikovurderingen af kemikalier, herunder kemikalier, der mistænkes for at være hormonforstyrrende stoffer. Eksponeringen i MEOGRT fortsætter indtil klækning (indtil to uger efter befrugtning) i anden (F2) generation. Der skal gennemføres yderligere undersøgelser for at begrunde det hensigtsmæssige i at forlænge F2-generationen efter klækning. På nuværende tidspunkt foreligger der ikke tilstrækkelige oplysninger til, at det kan fastslås, at de relevante betingelser eller kriterier for at forlænge F2-generationen foreligger. Denne forsøgsmetode kan imidlertid blive opdateret, i takt med at nye oplysninger og data tages i betragtning. Eksempelvis kan vejledning om forlængelse af F2-generationen være nyttig under visse omstændigheder (f.eks. kemikalier med et højt biokoncentrationspotentiale eller indikationer på virkninger gennem flere generationer i andre taxa). Denne forsøgsmetode kan anvendes til at vurdere kemikaliers, herunder potentielle hormonforstyrrende stoffers, potentielle kroniske virkninger hos fisk. ECx (effektkoncentration for × % virkning) er den koncentration, der har en virkning på × % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. Metoden lægger primært vægt på potentielle populationsrelevante virkninger (dvs. negative indvirkninger på overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion) ved beregningen af en No Observed Effect Concentration (koncentration uden observeret effekt – (NOEC)) eller en effektkoncentration (ECx), selv om det bør noteres, at ECx-tilgange sjældent er egnede til større undersøgelser af denne art, hvor forøgelse af antallet af testkoncentrationer med henblik på bestemmelse af den ønskede ECx kan være upraktisk og ligeledes kan give anledning til væsentlige bekymringer omkring dyrevelfærd på grund af det store antal dyr, der anvendes. Når det gælder kemikalier, der ikke kræver en vurdering over flere generationer, eller kemikalier, der ikke er potentielt hormonforstyrrende stoffer, kan andre forsøgsmetoder være mere hensigtsmæssige (1). Den japanske risfisk er velegnet til brug i denne forsøgsmetode på grund af dens korte livscyklus og muligheden for at bestemme dens genetiske køn (2), som anses for at være et afgørende element i denne forsøgsmetode. De specifikke metoder og de observerede endepunkter, der er beskrevet i denne metode, finder kun anvendelse på japansk risfisk. Andre små fiskearter (f.eks. zebrafisk) kan tilpasses en tilsvarende forsøgsprotokol.

2. Denne forsøgsmetode måler flere biologiske endepunkter. Der lægges primært vægt på potentielle negative effekter på populationsrelevante parametre, herunder overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion. Med henblik på at skaffe mekanistisk information og etablere forbindelser mellem resultaterne af andre former for felt- og laboratorieundersøgelser, hvor der foreligger *a posteriori* evidens for, at et kemikalie har potentielle hormonforstyrrende virkninger (*f.eks.* androgen eller østrogen aktivitet i andre forsøg og assays), kan der sekundært indhentes andre nyttige oplysninger ved at måle *vitellogenin* (*vtg)* mRNA (eller vitellogeninprotein, VTG), fænotypiske sekundære kønskarakteristika (SSC) i tilknytning til genetisk køn samt histopatologisk evaluering. Det bør bemærkes, at såfremt et kemikalie eller dets metabolitter ikke mistænkes for at være hormonforstyrrende stoffer, er det måske ikke nødvendigt at måle disse sekundære endepunkter, og mindre ressourcekrævende og dyreintensive undersøgelser kan være mere hensigtsmæssige (1). De definitioner, der er anvendt i denne forsøgsmetode, er anført i tillæg 1.

▼M8

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. På grund af det begrænsede antal kemikalier, der testes, og det begrænsede antal laboratorier, der er involveret i valideringen af dette ret komplekse assay, forventes det, at forsøgsmetoden, når der foreligger et tilstrækkeligt antal undersøgelser til, at virkningen af dette undersøgelsesdesign kan fastslås, vil blive gennemgået og om nødvendigt revideret i lyset af de indhøstede erfaringer. Dataene kan anvendes på niveau 5 i OECD's Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (3). Forsøgsmetoden starter med, at voksne fisk (F0-generationen) eksponeres for testkemikaliet i reproduktionsfasen. Eksponeringen fortsætter gennem udviklingen og reproduktionen i F1-generationen og klækningen af F2-generationen; dette assay gør det dermed muligt at evaluere såvel strukturelle som aktiveringsrelaterede endokrine reaktionsveje. Der kan gennemføres en weight of evidence-analyse ved fortolkningen af de endokrinrelaterede endepunkter.

4. Testen bør omfatte et passende antal individer for at sikre et tilstrækkeligt grundlag for evalueringen af reproduktionsrelevante endepunkter (jf. tillæg 3), samtidig med at det sikres, at det antal dyr, der anvendes, er det minimum, der kræves af hensyn til dyrevelfærden. I lyset af det store antal forsøgsdyr, der anvendes, er det vigtigt nøje at afveje behovet for at gennemføre testen mod eksisterende data, der måske allerede indeholder relevant information om mange af endepunkterne i MEOGRT. Nogen hjælp i denne henseende kan hentes fra OECD Fish Toxicity Testing Framework (1).

5. Forsøgsmetoden er primært udformet med henblik på at klarlægge virkningerne af et enkelt stof. Hvis et forsøg med en blanding er påkrævet, bør det imidlertid overvejes, om det vil give resultater, som er egnede til det tilsigtede lovmæssige formål.

6. Inden testen påbegyndes, er det vigtigt at indhente oplysninger om testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, navnlig for at gøre det muligt at fremstille stabile kemikalieopløsninger. Det er også nødvendigt, at der findes en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kontrol af koncentrationerne af testkemikaliet.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Testen indledes med at eksponere kønsmodne hanner og hunner (mindst 12 uger efter befrugtning) i ynglepar i 3 uger, og i denne periode fordeles testkemikaliet i forældregenerationens (F0) organismer i henhold til dets toksikokinetiske reaktionsmåde. Så tæt som muligt på den første dag i den fjerde uge indsamles æggene, så F1-generationen kan påbegyndes. Under opdræt af F1-generationen (i alt 15 uger) vurderes klækningsevnen og overlevelsen. Derudover udtages der prøver af fisk ved 9-10 uger efter befrugtning med henblik på udviklingsmæssige endepunkter, og gydningen vurderes i tre uger fra 12 til 14 uger efter befrugtning. En F2-generation påbegyndes efter den tredje uges reproduktionsvurdering, og den opdrættes, indtil klækningen er fuldført.

VALIDERINGSKRITERIER FOR TESTEN

8. Følgende kriterier for testens gyldighed finder anvendelse:

— Koncentrationen af opløst oxygen bør være ≥ 60 % af luftmætningsværdien under hele testforløbet.

— Den gennemsnitlige vandtemperatur under hele testen bør ligge mellem 24 og 26 °C. Kortvarige afvigelser fra gennemsnittet i de enkelte akvarier bør ikke være på mere end 2 °C.

▼M8

— Den gennemsnitlige frugtbarhed i kontrolgrupperne i hver generation (F0 og F1) bør være højere end 20 æg pr. par/dag. Fertiliteten af alle de æg, der gydes under vurderingen, bør være højere end 80 %. Derudover bør 16 af de anbefalede 24 kontrolynglepar (> 65 %) gyde over 20 æg pr. par/dag.

— Æggenes klækningsevne bør være ≥ 80 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (i hver enkelt F1- og F2-generation).

— Overlevelse efter klækning indtil 3 uger efter befrugtning og fra 3 uger efter befrugtning indtil afslutning af F1-generationen (dvs. 15 uger efter befrugtning) bør være henholdsvis ≥ 80 % (gennemsnit) og ≥ 90 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (F1).

— Der skal foreligge dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er opretholdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

Med hensyn til vandtemperaturen bør replikater inden for en behandling, selv om det ikke er et validitetskriterium, ikke være statistisk forskellige fra hinanden, og behandlingsgrupperne inden for testen bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden (baseret på daglige temperaturmålinger, idet der ses bort fra kortvarige afvigelser).

9. Selv om der observeres nedsat reproduktion i grupper udsat for højere eksponering, bør der være en tilstrækkelig reproduktion i mindst den tredjehøjeste gruppe og alle grupper derunder af F0 til at fylde klækningsinkubatorerne. Desuden bør der være en tilstrækkelig embryonoverlevelse i den tredjehøjeste og lavere eksponeringsgrupper i F1 til at muliggøre en endepunktsevaluering ved prøveudtagelsen af næsten fuldvoksne individer (jf. punkt 36 og 38 og tillæg 9). Derudover bør der være mindst minimal overlevelse efter klækning (~20 %) i den højeste eksponeringsgruppe i F1. Der er ikke tale om validitetskriterier som sådan, men om anbefalinger, der gør det muligt at beregne solide NOEC.

10. Hvis der observeres en afvigelse fra validitetskriterierne for testen, bør konsekvenserne holdes op imod forsøgsresultaternes pålidelighed, og disse afvigelser og overvejelser bør fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

11. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

a) oxygenmeter og pH-meter

b) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

c) egnet apparatur til temperaturkontrol og helst løbende overvågning

d) beholdere fremstillet af et kemisk inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 3)

e) vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0,5 mg).

▼M8

Vand

12. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet bør være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at fortyndingsvand ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne et kompleks med testkemikaliet) eller indvirker negativt på ynglebestandens præstationer, bør der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer bør foretages, f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand. Vandets pH skal ligge i intervallet 6,5-8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et interval på ± 0,5 pH-enheder.

Eksponeringssystem

13. Det design og de materialer, der anvendes til eksponeringssystemet, er ikke angivet. Glas, rustfrit stål eller andre kemisk inerte materialer bør anvendes til konstruktion af testsystemet, der ikke må være blevet kontamineret under tidligere forsøg. I forbindelse med denne test kan et velegnet eksponeringssystem bestå af et kontinuerligt gennemstrømningssystem (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testopløsninger

14. Stamopløsningen af testkemikaliet bør indføres i eksponeringssystemet ved hjælp af en egnet pumpe. Stamopløsningens flowrate bør kalibreres i overensstemmelse med den analytiske bekræftelse af testopløsningerne før påbegyndelse af eksponeringen, og den kontrolleres regelmæssigt via volumenmåling under testen. Testopløsningen i hvert enkelt kammer fornys med passende mellemrum (f.eks. mindst 5 volumenfornyelser/dag til op til 16 volumenfornyelser/dag eller op til 20 ml/min. flow) afhængigt af testkemikaliets stabilitet og vandkvaliteten.

15. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved en simpel mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydsbehandling). Mætningssøjler/-systemer eller passive doseringsmetoder (14) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen. Det bør tilstræbes at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: (1) visse opløsningsmidler i sig selv kan føre til toksicitet og/eller uønskede eller uventede reaktioner, (2) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker gennem brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, (3) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm som følge af mikrobiel aktivitet, som kan påvirke miljøforholdene og muligheden for at opretholde eksponeringskoncentrationer, og (4) i fravær af historiske data, der viser, at opløsningsmidlet ikke påvirker resultatet af undersøgelsen, kræver brugen af opløsningsmidler en behandling af kontrolkultur med opløsningsmiddel, der har dyrevelfærdsmæssige konsekvenser, da der kræves flere dyr for at udføre testen. Når der er tale om kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (Vejledning om vandtoksicitetstest af vanskelige stoffer og blandinger) (15), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af testkemikaliets kemiske egenskaber og tilgængeligheden af

▼M8

historiske data om brugen af opløsningsmidlet. Hvis der anvendes opløsningsmidler som bærestof, bør passende kontrolkulturer med opløsningsmiddel evalueres i tillæg til (negative) kontrolkulturer uden opløsningsmiddel (kun fortyndingsvand). Hvis brug af et opløsningsmiddel er uundgåelig, og mikrobiologisk aktivitet (biofilmdannelse) forekommer, anbefales det, at biofilmdannelsen i de enkelte tanke registreres/rapporteres (mindst ugentligt) under hele testforløbet. Ideelt bør opløsningsmiddelkoncentrationen holdes konstant i kontrolkulturen med opløsningsmiddel og i alle testbehandlingerne. Hvis koncentrationen af opløsningsmidlet ikke holdes konstant, bør den højeste koncentration af opløsningsmidlet i forsøgsbehandlingen anvendes i kontrolkulturen med opløsningsmiddel. I tilfælde hvor der anvendes opløsningsmiddel som bærestof, bør de maksimale opløsningsmiddelkoncentrationer ikke overstige 100 µl/l eller 100 mg/l (15), og det anbefales, at opløsningsmiddelkoncentrationen holdes så lav som muligt (*f.eks.* < 20 µl/l) for at undgå, at opløsningsmidlet påvirker de målte endepunkter (16).

Forsøgsdyr

Valg og hold af fisk

16. Forsøgsarten er japansk risfisk, *Oryzias latipes*, på grund af dens korte livscyklus og muligheden for at fastslå det genetiske køn. Selv om andre små fiskearter kan tilpasses til en tilsvarende forsøgsprotokol, finder de specifikke metoder og observerede endepunkter i denne forsøgsmetode kun anvendelse på japansk risfisk (jf. punkt 1). Japansk risfisk er nem at få til at yngle i fangenskab; der findes publicerede metoder til avl af den (17) (18) (19), og der foreligger data om dødeligheden på kort sigt, forsøg på den tidlige livsstadium og forsøg i den fulde livscyklus (5) (6) (8) (9) (20). Alle fisk udsættes for 16 timers lys og 8 timers mørke. Fiskene fodres med levende saltsøkrebs af arten *Artemia* spp., nauplii, som om nødvendigt kan suppleres med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt. Kommercielt tilgængeligt foder i flager bør regelmæssigt analyseres for forurenende stoffer.

17. Når en passende opdrætspraksis følges, kræves ingen specifik avlsprotokol. For eksempel kan japansk risfisk opdrættes i 2 l beholdere med 240 fiskelarver pr. tank indtil 4 uger efter befrugtning, derefter kan de opdrættes i 2 l beholdere med 10 fisk pr. beholder indtil 8 uger efter befrugtning, hvorefter de overføres til ynglepar i 2 l beholdere.

Akklimatisering og valg af fisk

18. Forsøgsfisk udvælges fra en enkelt laboratoriebestand, som i mindst to uger forud for testen er blevet akklimatiseret under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte (Bemærk: denne akklimatiseringsperiode er ikke en in situ-præeksponeringsperiode). Det anbefales, at forsøgsfiskene opnås fra avl i laboratoriet, da forsendelse af voksne fisk er stressende og kan påvirke en pålidelig gydning. Fiskene fodres med saltsøkrebs to gange om dagen i hele perioden og i eksponeringsfasen, om nødvendigt suppleret med kommercielt tilgængeligt foder i flager. Mindst 42 ynglepar (54 ynglepar, hvis der kræves en kontrolkultur med opløsningsmiddel, til dels på grund af manglende historiske data til støtte for brugen af kontrolkulturen uden opløsningsmiddel alene) anses for at være nødvendige til opstart af denne test for at opnå en passende replikation. Derudover bør det kontrolleres, at hvert enkelt ynglepar i F0-generationen består af XX-XY (dvs. normal tilstedeværelse af kønskromosomer i hvert køn) for at undgå en mulig medtagelse af spontane XX-hanner (jf. punkt 39).

▼M8

19. I akklimatiseringsperioden bør dødeligheden i fiskebestanden registreres, og følgende kriterier anvendes efter en 48-timers tilvænningsperiode:

— Dødeligheden er højere end 10 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: hele fiskegruppen kasseres.

— Dødeligheden er mellem 5 % og 10 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: akklimatisering i yderligere syv dage ud over akklimatiseringsperioden på to uger. Hvis dødeligheden er over 5 % i den anden syvdagesperiode, kasseres hele fiskegruppen.

— Dødeligheden er på under 5 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: fiskegruppen godkendes.

20. Fiskene bør ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden på to uger forud for testen og i eksponeringsperioden, og sygdomsbehandling bør helt undgås, hvis det er muligt. Fisk med kliniske sygdomstegn bør ikke anvendes i undersøgelsen. Der bør føres journal over observationer og eventuelle profylaktiske eller terapeutiske sygdomsbehandlinger i perioden forud for testen.

21. Eksponeringen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr ved 25 ± 2 °C. Fiskene bør identificeres som aktivt gydende (dvs. at de har produceret levedygtige unger) i ugen forud for eksponeringen. For hele fiskegruppen, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for ± 20 % af den aritmetiske gennemsnitsvægt for det relevante køn. Et deludsnit af fiskene bør vejes forud for testen for at anslå gennemsnitsvægten. Fiskene bør udvælges mindst 12 uger efter befrugtning og bør veje ≥ 300 mg for hunner og ≥ 250 mg for hanner.

TESTDESIGN

Testkoncentrationer

22. Det anbefales, at der anvendes fem koncentrationer af kemikaliet plus kontrol(ler). Alle informationskilder bør tages i betragtning ved bestemmelse af rækken af testkoncentrationer, herunder Quantitative Structure Activity Relationship (kvantitativ relation mellem struktur og aktivitet, QSAR), analogislutning, resultater af fisketest såsom assays for akut toksicitet for fisk (kapitel C.1 i dette bilag), fish short-term reproduction assay (assay for fisks reproduktion på kort sigt) (kapitel C.48 i dette bilag) og andre forsøgsmetoder, f.eks. kapitel C.15, C.37, C.41, C.47 eller C.49 i dette bilag (21) (22) (23) (24) (25) (26), hvis de foreligger, eller om nødvendigt fra en test til bestemmelse af dosisinterval, der muligvis omfatter en reproduktionsfase. Om nødvendigt kan testen til bestemmelse af dosisinterval gennemføres under forhold (vandkvalitet, testsystem, antal dyr pr. beholder), der svarer til dem, der anvendes i den endelige test. Hvis det er nødvendigt at anvende et opløsningsmiddel, og der ikke findes nogen historiske data, kan testen til bestemmelse af dosisinterval anvendes til at identificere opløsningsmidlets egnethed. Den højeste testkoncentration bør ikke overstige vandopløseligheden, 10 mg/l eller 1/10 af 96h-LC50 (27). Den laveste koncentration bør være 10 til 100 gange lavere end den højeste koncentration. Anvendelse

▼M8

af fem koncentrationer i denne test gør det muligt ikke blot at måle dosis/respons-forhold, men også den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og en NOEC, som er nødvendige i forbindelse med risikovurderingen i nogle lovmæssige programmer eller jurisdiktioner. Generelt er afstandsfaktoren mellem nominelle koncentrationer af testkemikaliet mellem tilgrænsende behandlingsniveauer ≤ 3,2.

Replikater inden for behandlingsgrupper og kontroller

23. Der bør anvendes mindst seks replikattestkamre pr. testkoncentration (jf. tillæg 7). I reproduktionsfasen (dog ikke F0-generationen) fordobles replikationsstrukturen i forbindelse med frugtbarhedsvurderingen, og hvert enkelt replikat består kun af ét ynglepar (jf. punkt 42).

24. Der bør gennemføres en kontrolkultur med fortyndingsvand, og om nødvendigt bør der gennemføres en kontrolkultur med opløsningsmiddel ud over testkoncentrationerne. Der bør anvendes det dobbelte antal replikatkamre til kontroller for at sikre en tilstrækkelig statistisk signifikans (dvs. at der skal anvendes mindst 12 replikater til kontrol). I reproduktionsfasen fordobles antallet af replikater i kontrollerne (dvs. at der som minimum skal være 24 replikater, og hvert enkelt replikat består kun af et ynglepar). Efter reproduktion bør kontrolreplikaterne ikke indeholde mere end 20 embryoner (fisk).

FREMGANGSMÅDE

Indledning af testen

25. De ynglende voksne fisk, der anvendes til at starte testens F0-generation, udvælges på grundlag af to kriterier: alder (typisk over 12 uger efter befrugtning, men det anbefales, at de ikke er ældre end 16 uger efter befrugtning) og vægt (bør være ≥ 300 mg for hunner og ≥ 250 mg for hanner).

26. Hun-han-par, der opfylder ovenstående specifikationer, flyttes som individuelle par til hvert enkelt replikat, dvs. 12 replikater i kontrolgruppen og seks replikater, der udsættes for kemisk behandling, ved testens start. Disse tanke tildeles vilkårligt en behandling (f.eks. T1-T5 og kontrol) og et replikat (f.eks. A-L i kontroller og A-F i behandling) og anbringes i eksponeringssystemet med et passende flow i hver enkelt beholder.

Eksponeringsbetingelser

27. Et fuldstændigt sammendrag af testparametre og -betingelser findes i tillæg 3. Overholdelse af disse specifikationer bør resultere i kontrolfisk med endepunktsværdier svarende til dem, der er oplistet i tillæg 4.

28. Under testen måles opløst ilt, pH og temperatur i mindst en testbeholder i hver behandlingsgruppe og kontrollen. Disse målinger, bortset fra temperaturmålingerne, udføres som minimum en gang om ugen i hele eksponeringsperioden. Den gennemsnitlige vandtemperatur skal ligge på mellem 24 og 26 °C under hele testen. Temperaturen måles hver dag i hele eksponeringsperioden. Vandets pH skal ligge i intervallet 6,5-8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et interval på ± 0,5 pH-enheder. Replikater inden for en behandling bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden, og behandlingsgrupperne i testen bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden (baseret på daglige temperaturmålinger, idet der ses bort fra kortvarige afvigelser).

▼M8

Eksponeringens varighed

29. I testen eksponeres seksuelt aktive fisk fra F0 i tre uger. I uge 4 på omkring testdag 24 bestemmes F1, og F0-yngleparrene aflives humant, og deres vægt og længde registreres (jf. punkt 34). Derefter eksponeres F1-generationen i yderligere 14 uger (i alt 15 uger for F1), og F2-generationen i to uger indtil klækning. Testen løber over i alt 19 uger (dvs. indtil F2 er klækket). Tidslinjerne for testen fremgår af tabel 2 og forklares i detaljer i tillæg 9.

Fodring

30. Fiskene kan fodres med levende saltsøkrebs af arten *Artemia* spp. (24 timer gamle nauplii) *ad libitum*, om nødvendigt suppleret med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt. Kommercielt tilgængeligt foder i flager bør regelmæssigt analyseres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af hormonforstyrrende stoffer (fytoøstrogener), som ville kompromittere testens respons, bør undgås. Uspiste foderrester og fækalt materiale bør fjernes fra testbeholderne efter behov, f.eks. ved omhyggeligt at rense bunden af hver beholder ved hjælp af en siphon. De enkelte beholderes sider og bund bør også rengøres en eller to gange om ugen (f.eks. ved at skrabe med en spatel). Et eksempel på en fodringsplan findes i tillæg 5. Fodringen baseres på antallet af fisk pr. replikat. Fodringen nedsættes derfor, hvis der forekommer dødsfald i replikatet.

Analytiske bestemmelser og målinger

31. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikalietilførselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder bør være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikaliet med passende intervaller, helst mindst en gang om ugen i et replikat i hver behandlingsgruppe, idet der skiftes mellem replikaterne inden for den samme behandlingsgruppe hver uge.

32. Under testen kontrolleres flowraterne for fortyndingsmidlet og stamopløsningen med passende intervaller (f.eks. mindst tre gange om ugen). Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af de målte gennemsnitsværdier gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier. Såfremt kemikalierne ophobes markant i fiskene, kan testkoncentrationerne mindskes, efterhånden som fiskene vokser. I sådanne tilfælde anbefales det, at fornyelseshastigheden af testopløsningen i hvert enkelt kammer tilpasses med henblik på at holde testkoncentrationerne så stabile som muligt.

Observationer og målte endepunkter

33. De målte endepunkter omfatter frugtbarhed, fertilitet, klækning, vækst og overlevelse med henblik på evaluering af mulige effekter på populationen. Der bør også dagligt foretages observationer af adfærd, og usædvanlig adfærd noteres. Andre mekanistiske endepunkter omfatter hepatisk *vtg* mRNA eller VTG-proteinniveauer i et immunoassay (28), fænotypiske kønsmarkører som karakteristiske papillære strukturer på gatfinnen hos hanner, evaluering af køn baseret på væv fra kønskirtler og histopatologisk evaluering af nyrer, lever og kønskirtler (jf. listen over endepunkter i tabel 1). Alle disse specifikke endepunkter evalueres i forbindelse med bestemmelse af individets genetiske køn baseret på tilstedeværelsen eller fraværet af det gen, der bestemmer hankøn hos japansk risfisk, *dmy* (jf. punkt 41). Derudover vurderes den tid, der går inden gydning. Endvidere kan simple fænotypiske kønsfordelinger udledes ved hjælp af information fra tællinger

▼M8

af
papillære strukturer på gatfinnen med henblik på bestemmelse af de individuelle japanske risfisk som fænotypiske hanner eller hunner. Denne forsøgsmetode forventes ikke at påvise beskedne afvigelser fra det forventede forhold mellem kønnene, fordi det relativt lille antal fisk pr. replikat ikke vil være tilstrækkeligt statistisk signifikant. Under den histopatologiske bedømmelse evalueres kønskirtlen, og der foretages langt mere indgående analyser med henblik på bestemmelse af kønskirtelfænotypen i forbindelse med det genetiske køn.

34. Det primære formål med denne forsøgsmetode er at vurdere testkemikaliets potentielle populationsrelevante effekter. Mekanistiske endepunkter (VTG, SSC'er og visse histopatologiske effekter på kønskirtlerne) kan også bidrage til en klarlæggelse af, om eventuelle effekter medieres via endokrin aktivitet. Disse mekanistiske endepunkter kan dog også påvirkes af systemisk toksicitet og andre former for toksicitet. Derfor kan lever- og nyrehistopatologi også vurderes indgående for at bidrage til en bedre forståelse af eventuelle responser i mekanistiske endepunkter. Hvis sådanne detaljerede evalueringer ikke udføres, bør iøjnefaldende abnormiteter, der observeres tilfældigt under den histopatologiske evaluering, dog fortsat noteres og rapporteres.

Human aflivning af fisk

35. Ved afslutningen af eksponeringen af F0- og F1-generationerne, og hvor der udtages delprøver af næsten fuldvoksne fisk, aflives fiskene med passende mængder bedøvelsesmiddel (f.eks. tricainmethansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l), bufret med 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne. Hvis fiskene viser tegn på, at de lider meget (virkelig meget, og det med pålidelighed kan forudsiges, at de vil dø) og betragtes som døende, bør de bedøves og aflives og behandles som dødelighed i forbindelse med dataanalysen. Når en fisk aflives på grund af dødelighed, skal det noteres og rapporteres. Afhængigt af, hvornår fiskene aflives i løbet af undersøgelsen, kan de opbevares med henblik på histopatologiske analyser (fiksering af fiskene med henblik på eventuel histopatologi).

Håndtering af æg og larver

Indsamling af æg fra yngleparrene med henblik på opformering af den næste generation

36. Indsamlingen af æg foregår den første dag (eller de første to dage, hvis det er nødvendigt) af testuge 4 for at gå fra F0 til F1 og testuge 18 for at gå fra F1 til F2. Testuge 18 svarer til F1, voksne fisk 15 uger efter befrugtning. Det er vigtigt, at alle æggene fjernes fra de enkelte tanke dagen før, indsamlingen af æg påbegyndes, for at sikre at alle de æg, der indsamles fra et ynglepar, stammer fra en enkelt gydning. Efter gydningen bærer hunnen hos japansk risfisk undertiden æggene i nærheden af gattet, indtil de kan anbringes på et substrat. Da der ikke findes noget substrat i beholderen, kan æggene findes enten hæftet på hunnen eller i bunden af beholderen. Afhængigt af deres placering fjernes æggene forsigtigt fra hunnen eller suges op fra bunden i testuge 4 for F0 og testuge 18 for F1. Alle de æg, der indsamles i en behandling, samles, inden de fordeles i inkubationskamre.

▼M8

37. Ægfilamenterne, der holder de gydede æg sammen, bør fjernes. Befrugtede æg (op til 20) indsamles fra hvert ynglepar (1 par pr. replikat), samles for hver behandling og fordeles systematisk i passende inkubationskamre (tillæg 6, 7). Ved hjælp af et dissektionsmikroskop af god kvalitet kan de karakteristiske tegn på tidlig befrugtning/udvikling som f.eks. fortykkelse af fertiliseringsmembranen (chorion), igangværende celledeling eller udvikling af blastula ses. Inkubationskamrene kan anbringes i separate "inkubationsakvarier", der er sat op til hver enkelt behandling (i dette tilfælde skal parametrene for vandkvalitet og koncentrationerne af testkemikalier i disse akvarier måles), eller i replikatakvariet, i hvilket de klækkede larver (*f.eks.* eleutheroembryon) vil blive opbevaret. Hvis der er behov for en anden indsamlingsdag (testdag 23), bør alle æggene fra begge dage samles og derefter systematisk omfordeles i hvert af behandlingsreplikaterne.

Pasning af æg indtil klækning

38. De befrugtede æg bevæges konstant, *f.eks.* i æginkubatoren ved hjælp af luftbobler eller ved at æginkubatoren svinges vertikalt. Dødeligheden af befrugtede æg (embryoner) kontrolleres og registreres dagligt. Døde æg fjernes fra inkubatorerne (tillæg 9). På den 7. dag efter befrugtningen (dpf) standses eller reduceres bevægelsen, så de befrugtede æg lægger sig på bunden af inkubatoren. Dette fremmer klækning typisk i løbet af de næste 1-2 dage. For hver behandling og kontrol tælles fiskeynglen (unge larver, eleutheroembryon) (samlet replikat). Befrugtede æg, der ikke er klækket inden for to gange mediandagen for klækning i kontrollen (typisk 16 eller 18 dpf), betragtes som ikke-levedygtige og kasseres.

39. 12 individer af fiskeynglen overføres til hver replikatbeholder. Fiskeynglen fra inkubationskamrene samles og fordeles systematisk i replikatbeholderne (tillæg 7). Dette kan ske ved vilkårlig udvælgelse af et individ af fiskeynglen fra behandlingsgruppen, hvorefter der successivt tilfældigt udvælges et individ, som overføres til et replikatakvarium. Hver beholder skal indeholde et lige antal (n=12) af de klækkede larver (maksimalt 20 larver i hver). Hvis der ikke er nok fiskeyngel til at fylde behandlingsreplikaterne, anbefales det, at det sikres, at så mange replikater som muligt har 12 individer. Fiskeynglen kan håndteres sikkert med glaspipetter med stor huldiameter. Eventuel overskydende fiskeyngel aflives humant med bedøvelsesmiddel. I de få uger forud for sammensætningen af ynglepar, registreres den dag, hvor den første gydning observeres i hvert enkelt replikat.

Sammensætning af ynglepar

Klipning af finnerne og bestemmelse af det genotypiske køn

40. Bestemmelse af det genotypiske køn ved hjælp af finneklipning foregår 9-10 uger efter befrugtning (dvs. testuge 12-13 for F1-generationen). Alle fisk i en tank bedøves (ved hjælp af godkendte metoder, f.eks. IACUC), og en lille vævsprøve udtages enten fra rygfinnen eller den ventrale spids på halefinnen på hver fisk med henblik på bestemmelse af individets genotypiske køn (29). Fiskene fra et replikat kan anbringes i små bure, om muligt én pr. bur, i replikatbeholderen. Alternativt kan to fisk anbringes i hvert bur, hvis de kan skelnes fra hinanden. En metode går ud på til at variere klipning af halefinnen (*f.eks.* den dorsale spids i modsætning til den ventrale spids), når vævsprøven udtages.

▼M8

41. Japansk risfisks genotypiske køn bestemmes ved hjælp af et identificeret og sekvenseret gen (*dmy*), som befinder sig på Y-kromosomet. Tilstedeværelsen af *dmy* viser et XY-(han)individ uanset fænotype, mens fraværet af *dmy* viser et XX-(hun)individ) uanset fænotype (30). (31). Deoxyribonukleinsyre (DNA) fra hvert finneklip ekstraheres, og tilstedeværelsen eller fraværet af *dmy* kan bestemmes ved hjælp af en polymerasekædereaktion (PCR) (jf. tillæg 9 i kapitel C.41 i dette bilag, eller tillæg 3 og 4 i (29).

Etablering af ynglepar

42. Information om det genotypiske køn anvendes til at etablere XX-XY-ynglepar uanset ekstern fænotype, som kan ændres ved eksponering for testkemikaliet. Dagen efter genotypebestemmelsen af hver enkelt fisk, udvælges der tilfældigt to XX-fisk og to XY-fisk fra hvert replikat, og der etableres to XX-X-ynglepar. Hvis et replikat ikke har enten to XX- eller to XY-fisk, bør der hentes fisk fra andre replikater inden for behandlingen. Det bør prioriteres, at der er det anbefalede antal replikatynglepar (12) i hver behandling og i kontrollerne (24). Fisk med synlige abnormiteter (svømmeblæreproblemer, rygsøjlemisdannelser, ekstreme størrelsesvariationer osv.) udelukkes ved etableringen af ynglepar. I reproduktionsfasen for F1 bør hver replikatbeholder kun indeholde et ynglepar.

Udtagelse af prøver af unge individer og endepunktsvurdering

Udtagelse af prøver af fisk, der ikke indgår i ynglepar

43. Efter sammensætningen af ynglepar aflives de fisk, der ikke udvælges til videreavl, humant med henblik på måling af endepunkterne for næsten fuldvoksne individer i testuge 12-13 (F1). Det er meget vigtigt, at fiskene håndteres på en sådan måde, at bestemmelsen af genotypisk køn med henblik på etablering af ynglepar fortsat kan spores til den enkelte fisk. Alle de data, der indsamles, analyseres i forhold til den specifikke fisks genotypiske køn. Hver enkelt fisk anvendes til en række endepunktsmålinger, herunder: bestemmelse af overlevelsesrater for ungfisk/næsten fuldvoksne individer (testuge 7-12/13 (F1)), vækst i længde (standardlængden kan måles, hvis halefinnen er blevet afkortet på grund af udtagelse af prøven til bestemmelse af det genetiske køn). Den samlede længde kan måles, hvis blot en del af halefinnen (dorsal eller ventral) er udtaget til bestemmelse af *dmy*), og kropsvægt (dvs. vådvægt, vægt, når den er duppet tør), lever *vtg* mRNA (eller VTG) og papillære strukturer på gatfinnen (jf. tabel 1 og 2). Bemærk, at yngleparrenes vægt og længde også skal bruges ved beregning af den gennemsnitlige vækst i en behandlingsgruppe.

Vævsprøvetagning og vitellogeninmåling

44. Leveren dissekeres og opbevares ved ≤ -70 °C, indtil *vtg* mRNA (eller VTG) målingerne foretages. Fiskens hale, herunder gatfinnen, præpareres i et passende fiksativ (f.eks. Davidson's) eller fotograferes, så papillære strukturer på gatfinnen kan tælles på et senere tidspunkt. Hvis det ønskes, kan der samtidig udtages og præpareres andre vævsprøver (dvs. af kønskirtlerne). Lever-VTG-koncentrationen måles ved hjælp af en homolog ELISA-teknik (jf. de anbefalede procedurer for japansk risfisk i tillæg 6 i kapitel C.48 i dette bilag). Alternativt er metoderne til måling af vtg mRNA, dvs. *vtg I* gen mRNA-ekstraktion fra en leverprøve og måling af antallet af kopier af *vtg I* genet (pr. ng af samlet mRNA) ved hjælp af kvantitativ PCR blevet fastlagt

▼M8

af U.S EPA (29). I stedet for at bestemme antallet af kopier af *vtg* genet i kontrol- og behandlingsgrupper består en mere ressourcevenlig og mindre teknisk vanskelig metode i at bestemme den relative (fold-)ændring i *vtg I*-ekspressionen i kontrol- og behandlingsgrupperne.

Sekundære kønskarakteristika

45. Under normale omstændigheder har kun kønsmodne hanner af japansk risfisk papillære strukturer, som udvikles på nogle af finnestrålernes ledskiver som sekundære kønskarakteristika, der kan fungere som potentiel biomarkør for hormonforstyrrende virkninger. Metoden til tælling af papillære strukturer på gatfinnen (antal ledskiver med papillære strukturer) findes i tillæg 8. Antallet af papillære strukturer på gatfinnen anvendes ligeledes til at kategorisere det pågældende individ som ekstern fænotypisk han eller hun med henblik på beregningen af et enkelt forhold mellem kønnene pr. replikat. En japansk risfisk med mere end 0 papillære strukturer på gatfinnen defineres som en han; en japansk risfisk med 0 papillære strukturer på gatfinnen defineres som en hun.

Vurdering af frugtbarhed og fertilitet

46. Frugtbarhed og fertilitet bedømmes i testuge 1-3 i F0-generationen og i testuge 15-17 i F1-generationen. Æg indsamles dagligt fra hvert ynglepar i 21 på hinanden følgende dage. Æggene fjernes forsigtigt fra hunner fanget i net og/eller opsuges fra bunden af akvariet hver morgen. Både frugtbarhed og fertilitet registreres dagligt for hvert ynglepar i replikaterne. Frugtbarhed defineres som antallet af gydede æg, og fertiliteten defineres funktionelt som antallet af befrugtede og levedygtige æg på tidspunktet for tællingen. Tællingen bør ske hurtigst muligt efter indsamlingen af æggene.

47. Replikatfrugtbarheden registreres dagligt som antal æg pr. ynglepar, der analyseres ved hjælp af de anbefalede statistiske procedurer og gennemsnitsværdierne for replikatet. Replikatets fertilitet er summen af antallet af befrugtede æg, som et ynglepar har produceret, divideret med antallet af æg, som dette par har gydet. I statistisk henseende analyseres fertiliteten som et forhold pr. replikat. Klækningsevnen i replikatet er antallet af fiskeyngelindivider divideret med antallet af tilførte embryoner (typisk 20). I statistisk henseende analyseres klækningsevnen som et forhold pr. replikat.

Prøveudtagning af voksne og endepunktsvurdering

Prøveudtagning af ynglepar

48. Efter testuge 17 (dvs. når F2-generationen er startet godt) aflives de voksne i F1-generationen humant, og forskellige endepunkter vurderes (jf. tabel 1 og 2). Gatfinnen fotograferes med henblik på vurdering af papillære strukturer på gatfinnen (jf. tillæg 8), og/eller halen lige efter gattet fjernes og fikseres med henblik på en senere tælling af papillære strukturer. En del af halefinnen kan udtages til prøve og arkiveres på dette tidspunkt med henblik på verifikation af genetisk køn (*dmy)*, hvis det ønskes. Om nødvendigt kan der udtages en vævsprøve for at gentage *dmy*-analysen med henblik på at verificere specifikke fisks genetiske køn. Bughulen åbnes for at tillade perfusion med passende fikseringsmiddel (f.eks. Davidson's), inden hele kroppen nedsænkes i fikseringsmidlet. Foretages der et passende permealiseringstrin forud for fikseringen, er det imidlertid ikke nødvendigt at åbne bughulen.

▼**M8**

Histopatologi

49. Hver enkelt fisk undersøges histologisk for sygdomme i kønskirtelvævet (30); (29). Som anført i punkt 33 kan andre endepunkter, der vurderes i dette assay (dvs. VTG, SSC'er og visse histopatologiske effekter på kønskirtlerne), påvirkes af systemisk toksicitet og andre former for toksicitet. Derfor kan lever- og nyrehistopatologi også vurderes indgående for at bidrage til en bedre forståelse af eventuelle responser i mekanistiske endepunkter. Hvis sådanne detaljerede evalueringer ikke udføres, bør iøjnefaldende abnormiteter, der observeres tilfældigt under den histopatologiske evaluering, dog fortsat noteres og rapporteres. "Analogislutninger" fra den højeste behandlingsgruppe (sammenlignet med kontrollen) til en behandling uden nogen virkning kan overvejes, men det anbefales dog, at vejledningen om histopatologi læses (29). Typisk behandles alle prøverne, og/eller der laves tyndsnit, hvorefter de fortolkes af en patolog. Hvis der anvendes en tilgang med "analogislutninger", bemærkes det, at Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS)-proceduren anvender forventningen om, at når dosis forhøjes, øges de biologiske effekter (patologien) også. Derfor vil man miste effekt, hvis man kun ser på en enkelt høj dosis uden at se på nogen mellemhøje doser. Hvis den statistiske analyse ikke er nødvendig for at bestemme, at den høje dosis ikke har nogen virkning, kan denne tilgang accepteres. Fænotypen i kønskirtlerne bedømmes også ved denne vurdering.

Andre observationer

50. MEOGRT resulterer i data, der kan anvendes (f.eks. i en weight of evidence-analyse) til samtidigt at vurdere mindst to generelle typer af adverse outcome pathways (AOP'er), der ender i forringet reproduktion: (a) endokrinmedierede toksicitetsveje, der indebærer forstyrrelser af hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG)-endokrinaksen; og (b) toksicitetsveje, der forårsager nedsat overlevelse, vækst (længde og vægt) og reproduktion via ikke-endokrinmedieret toksicitet. De endepunkter, der typisk måles i kroniske toksicitetstest såsom fuld livscyklus-testen og test i det tidlige livsstadium, indgår i denne test og kan anvendes til at vurdere de farer, som udgøres af såvel ikke-endokrinmedierede toksiske virkemåder og endokrinmedierede toksicitetsveje. Under testen foretages der dagligt observationer af adfærd, og usædvanlig adfærd noteres. Derudover registreres eventuel dødelighed og overlevelse frem til udvælgelsen (testuge 6/7), overlevelse efter udvælgelse af prøver af næsten fuldvoksne individer (9-10 uger efter befrugtning), og overlevelsen fra etablering af par til udtagelsen af prøver af fuldvoksne fisk beregnes.

Tabel 1

Endepunktsoversigt for MEOGRT (*)

Livsstadium	Endepunkt	Generation
Embryoner (2 uger efter befrugtning)	Klækning (% og tidspunkt for klækning)	F1, F2
Ung (4 uger efter befrugtning)	Overlevelse	F1
Næsten fuldvoksen (9 eller 10 uger efter befrugtning)	Overlevelse	F1
	Vækst (længde og vægt)	

▼M8

Livsstadium	Endepunkt	Generation
	Vitellogenin (mRNA eller protein)	
	Sekundære kønskarakteristika (papillære strukturer på gatfinnen)	
	Eksternt forhold mellem kønnene	
	Tid til 1. gydning	
Fuldvoksen (12-14 uger efter befrugtning)	Reproduktion (frugtbarhed og fertilitet)	F0, F1
Fuldvoksen (15 uger efter befrugtning)	Overlevelse	F1
	Vækst (længde og vægt)	
	Sekundære kønskarakteristika (papillære strukturer på gatfinnen)	
	Histopatologi (kønskirtel, lever, nyre)	

(*) Disse endepunkter analyseres statistisk

TIDSPLAN

51. En tidslinje for MEOGRT illustreret i tabel 2 viser testen. MEOGRT omfatter 4 uger med eksponering af F0-voksne og 15 uger med eksponering af F1-generationen, og eksponeringsperioden for den anden generation (F2) indtil klækning (2 uger efter befrugtning). Aktiviteten i løbet af MEOGRT er sammenfattet i tillæg 9.

Tabel 2

Eksponering og måling af endepunktstidslinjer for MEOGRT

MEOGRT eksponerings- og endepunktstidsplan

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Testuge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Nøgle til livsstadium					**Embryoner**					**Larve**					**Ung**			**Næsten fuldvoksen**	**Fuldvoksen**
Endepunkter																			
Frugtbarhed	F_0														$F_{1)}$				
Fertilitet	F_0														$F_{1)}$				
Klækning					$F_{1)}$														F_2
Overlevelse						$F_{1)}$						$F_{1)}$						$F_{1)}$	
Vækst				F_0								$F_{1)}$						$F_{1)}$	
Vitellogenin												$F_{1)}$							
Sekundære kønskarakteristika												$F_{1)}$						$F_{1)}$	
Histopatologi																		$F_{1)}$	
Testuge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Testdesignet har 7 grupper af replikater
  - 5 til behandling med testkemikalie
  - 2 til kontrolbehandling (4, hvis der anvendes et opløsningsmiddel)
- Design inden for gruppen
  - 12 replikater til reproduktion, voksenpatologi og SSC (uge 10-18)
  - 6 replikater til klækning, overlevelse, Vtg; og - SSC for næsten fuldvoksne individer og vækst (uge 1-9)

SSC: sekundære kønskarakteristika

Vtg: vitellogenin

▼M8

DATA OG RAPPORTERING

Statistisk analyse

52. Da det genotypiske køn bestemmes for alle fiskene, bør dataene analyseres separat for hvert genotypisk køn (dvs. XY-hanner og XX-hunner). Sker dette ikke, vil det i høj grad reducere den statistiske signifikans af enhver analyse. Statistiske dataanalyser skal helst følge de procedurer, der er beskrevet i OECD's Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (32). Tillæg 10 indeholder yderligere vejledning om statistiske analyser.

53. Testdesignet og valget af statistisk test bør give tilstrækkelig styrke til at påvise ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC-værdi (32). Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovmæssige rammer. Den procentvise ændring i hvert af de endepunkter, som det er vigtigt at undersøge eller vurdere, bør påvises. Testdesignet bør tilpasses til dette formål. Det er ikke sandsynligt, at den samme procentvise ændring gælder for alle endepunkter, og det er heller ikke sandsynligt, at der kan designes et forsøg, som opfylder disse kriterier for alle endepunkter, og man bør derfor i forbindelse med testdesignet fokusere på de endepunkter, der er vigtige for de respektive forsøg. Et statistisk flowdiagram og retningslinjer findes i tillæg 10 som hjælp til databehandlingen og valget af den mest egnede statistiske test eller model. Andre statistiske metoder kan anvendes, forudsat at de er videnskabeligt begrundede.

54. Det er, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse eller kontingenstabelprocedurer, og der bør anvendes tilstrækkelige og passende statistiske metoder på grundlag af denne analyse. Med henblik på at foretage mange sammenligninger af resultaterne ved de enkelte koncentrationer og af kontrollerne, anbefales den nedadgående procedure (f.eks. Jonckheere-Terpstra test) til kontinuerlige responser. Når dataene ikke er overensstemmende med en monoton koncentration/respons, bør Dunnetts test eller Dunns test anvendes (om nødvendigt efter en passende datatransformation).

55. I forbindelse med frugtbarhed foretages ægtællingen dagligt, men den kan analyseres som det samlede antal æg eller som en gentagen foranstaltning. Tillæg 10 indeholder nærmere oplysninger om, hvordan dette endepunkt analyseres. I forbindelse med histopatologiske data, der antager form af alvorsgrad, er der blevet udviklet en ny statistisk test, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Eventuelle endepunkter, der observeres i kemiske behandlinger, og som afviger betydeligt fra den tilknyttede kontrol, skal rapporteres.

Dataanalyseovervejelser

Brug af kompromitterede behandlingsniveauer

57. Der skal tages hensyn til flere faktorer, når det bestemmes, om et replikat eller en hel behandling påviser åbenlys toksicitet og skal fjernes fra analysen. Åbenlys toksicitet defineres som > 4 dødsfald i et replikat mellem 3 uger efter befrugtning og 9 uger efter befrugtning, som ikke kan forklares ved en teknisk fejl. Andre tegn på åbenlys toksicitet omfatter blødning, abnorm adfærd, abnorme svømmemønstre, anoreksi og andre kliniske sygdomstegn.

▼M8

For subletale tegn på toksicitet kan kvalitative vurderinger være nødvendige og bør altid foretages i forhold til gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand (kun rent vand). Hvis åbenlys toksicitet forekommer ved de højeste behandlinger, anbefales det, at disse dosisbehandlinger udgår af analysen.

Kontrolkulturer med opløsningsmiddel

58. Opløsningsmidler bør kun bruges som en sidste udvej, når alle andre muligheder for kemikalietilførsel er blevet overvejet. Hvis der bruges et opløsningsmiddel, bør der samtidig gennemføres en kontrolkultur med fortyndingsvand. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger. Dette sker ved en statistisk sammenligning af gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand. De mest relevante endepunkter, der skal tages i betragtning i forbindelse med denne analyse, er vækstdeterminanterne (vægt), da disse kan påvirkes af en generel toksicitet. Hvis der påvises statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand og gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, bør den bedste faglige vurdering anvendes til at bestemme, om gyldigheden af testen er kompromitteret. Hvis de to kontroller afviger fra hinanden, bør de behandlinger, der er eksponeret for kemikaliet, sammenlignes med gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, medmindre det er velkendt, at sammenligning med gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand foretrækkes. Hvis der ikke findes nogen statistisk signifikant forskel mellem de to grupper af kontrolkulturer, anbefales det, at de behandlinger, der er eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med de samlede grupper (grupperne af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og fortyndingsvand), medmindre det er velkendt, at sammenligning med enten gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand eller gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel foretrækkes.

Testrapport

59. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie: fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— Kemisk identifikation.

Stof med kun én bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

— så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter:

— Videnskabeligt navn, stamme, hvis oplysninger herom foreligger, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og den efterfølgende håndtering af dem.

Testbetingelser:

— Lysperiode(r)

— Testdesign (f.eks. testkamrenes størrelse, materiale og vandmængde, antal testkamre og replikater, antal fiskeyngelindivider pr. replikat)

▼**M8**

— Fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)

— Metode til dosering af testkemikaliet (f.eks. pumper, fortyndingssystemer)

— Metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, grænsen for kvantitativ bestemmelse, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i en egentlig opløsning

— Fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restchlorniveau (hvis målt), total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og alle andre målinger, der er foretaget

— de nominelle testkoncentrationer, de målte middelværdier og deres standardafvigelser

— vandkvalitet i testbeholderne, pH, temperatur (dagligt) og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype, -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultater:

— bevis for, at kontrollerne opfyldte de generelle validitetskriterier for overlevelse

— data for kontrolgruppen (og kontrolkulturen med opløsningsmiddel, når en sådan anvendes) og behandlingsgrupperne som følger: klækning (klækningsevne og tidspunkt for klækning) for F1 og F2, overlevelse efter klækning for F1, vækst (længde og kropsvægt) for F1, genotypisk køn og kønsdifferentiering (f.eks. sekundære kønskarakteristika baseret på papillære strukturer på gatfinnen og kønskirtelhistologi) for F1, fænotypisk køn for F1, sekundære kønskarakteristika (papillære strukturer på gatfinnen) for F1 *vtg* mRNA (eller VTG protein) for F1, histopatologisk vurdering (kønskirtel, lever og nyre) for F1 og reproduktion (frugtbarhed og fertilitet) for F0, F1 (jf. tabel 1 og 2)

— statistisk analysemetode (regressionsanalyse eller variansanalyse) og behandling af data (anvendte statistiske test og modeller)

— koncentration uden observeret effekt (NOEC) ved hver måling

— laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) ved hver måling (ved p = 0,05). EC_x for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 90 % eller 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentrationsresponskurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse

— eventuelle afvigelser fra denne forsøgsmetode og afvigelser fra acceptkriterierne og overvejelser af de potentielle konsekvenser for resultaterne af testen.

▼M8

60. I forbindelse med resultaterne af endepunktsmålingerne bør gennemsnitsværdierne og deres standardafvigelser (om muligt for såvel replikat som koncentration) præsenteres.

LITTERATUR

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K og Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T og Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T og Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology og Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H og Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H og Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H og Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M og Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M og Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T og Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Tilgængelig på: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P og McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity test. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OECD draft (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ og Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE og Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ og Hinton DE. (1999). Variations of Light og Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K og Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K og Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Kapitel C.15 i dette bilag, Fisk, korttidstoksicitetstest udført på fiskeembryoner og blommesækyngel.

(22) Kapitel C.37 i dette bilag, 21-dages assay med fisk: En korttidsscreeningstest for østrogene og androgene virkninger og aromatasehæmning.

(23) Kapitel C.41 i dette bilag, Test af fisks kønsudvikling.

(24) Kapitel C.48 i dette bilag, Assay for fisks reproduktion på kort sigt.

(25) Kapitel C.47 i dette bilag, Toksicitetstest med fisk i de tidlige udviklingsstadier.

(26) Kapitel C.49 i dette bilag, Test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L og Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M og Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M og Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S og Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN og Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymkoblet immunadsorptionsassay).

Frugtbarhed = antal æg.

Fertilitet = antal levedygtige æg/frugtbarhed.

Længde til haledelingspunkt (FL) angiver længden fra snudespids til enden af halefinnens midterste finnestråle og bruges ved fisk, hvor det er svært at afgøre, hvor rygsøjlen ender, www.fishbase.org.

Klækningsevne = fiskeyngel/antal tilførte embryoner i en inkubator.

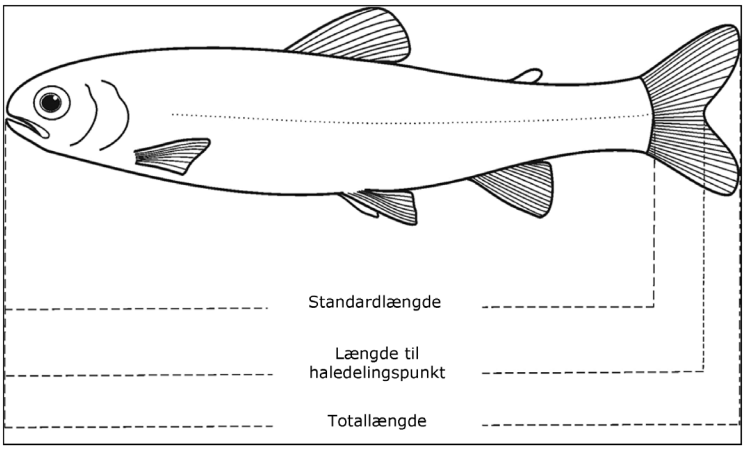
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee.

Standardlængde (SL) angiver længden af en fisk målt fra snudespids til bagkanten af den sidste ryghvirvel eller bagkanten af den midtlaterale del af hypuralpladen. Denne måling udelukker ganske enkelt halefinnens længde (www.fishbase.org).

Totallængde (TL) angiver længden fra snudespids til halefinnens længste spids, sædvanligvis målt med spidserne komprimeret langs midterlinjen. Det er et lineært mål, og der måles ikke langs kroppens kurve (www.fishbase.org)

Figur 1

Beskrivelse af de forskellige anvendte længder



ECx: (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. F.eks. er EC50 en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Gennemstrømningstest er en test med en stadig strøm af testopløsninger gennem testsystemet under hele eksponeringen.

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

▼M8

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Belastningsgrad: fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, der er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt. Tillæg 5 og 6 indeholder retningslinjer.

Middel letal koncentration 50 (LC50): den koncentration af testkemikaliet, som skønnes at være dødelig for 50 % af testorganismerne i løbet af testens varighed.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringstid.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Bestandtæthed: antallet af fisk pr. vandvolumen.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

VTG: vitellogenin er en phospholipid-glycoprotein-prækursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

WPF: uger efter befrugtning

▼**M8**

Tillæg 2

NOGLE KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Stof	Koncentrationsgrænse
Partikler	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

▼**M8**

Tillæg 3

TESTBETINGELSER FOR MEOGRT

1.	Anbefalet art	Japansk risfisk (*Oryzias latipes*)
2.	Testtype	Gennemstrømningstest
3.	Vandtemperatur	Den nominelle testtemperatur er 25 °C. Gennemsnitstemperaturen i hver enkelt beholder er 24-26°C.
4.	Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede og ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5.	Lysperiode	16 t. lys, 8 t. mørke
6.	Belastningsgrad	F0: 2 voksne/replikat F1: startes med højst 20 æg (embryoner)/replikat, reduceret til 12 embryoner/replikat ved klækning, derefter 2 voksne (XX-XY ynglepar) ved 9-10 uger efter befrugtning til reproduktionsfasen
7.	Det mindste brugbare testkammervolumen	1,8 l (f.eks. testkammerstørrelse: 18x9x15 cm)
8.	Volumenudskiftning af testopløsninger	Minimum 5 volumenfornyelser/dag og op til 16 volumenudskiftninger/dag (eller gennemstrømning på 20 ml/min.)
9.	Testorganismernes alder ved start	F0: > 12 uger efter befrugtning, men det anbefales, at de ikke er ældre end 16 uger efter befrugtning
10.	Antal organismer pr. replikat	F0: 2 fisk (par med en han og en hun); F1: maksimum 20 fisk (æg)/replikat (avlet af F0 og F1 ynglepar).
11.	Antal behandlinger	5 testkemikaliebehandlinger plus passende kontrol(ler)
12.	Antal replikater pr. behandling	Minimum 6 replikater pr. behandling for testkemikaliet og minimum 12 replikater for kontrollen og for kontrolkulturen med opløsningsmiddel, hvis der anvendes en sådan (antallet af replikater fordobles i reproduktionsfasen i F1)
13.	Antal organismer pr. test	Minimum 84 fisk i F0 og 504 i F1. (Hvis der anvendes en kontrolkultur med opløsningsmiddel, så 108 fisk i F0 og 648 fisk i F1). Den enhed, der tælles, er post-eleutheroembryon.
14.	Fodring	Fiskene fodres med saltsøkrebs af arten *Artemia* spp. (24 timer gamle nauplii) ad libitum, om nødvendigt suppleret med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt (et eksempel på en fodringsplan, der skal sikre en passende vækst og udvikling for at sikre en sund reproduktion, findes i tillæg 5).

▼**M8**

15. Beluftning	Ingen, medmindre den opløste ilt nærmer sig < 60 % af luftmætningsværdien.
16. Fortyndingsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afchloret ledningsvand.
17. Eksponeringsperiode	Primært 19 uger (fra F0 til klækning af F2)
18. Biologiske endepunkter (primære)	Klækningsevne (F1 og F2); overlevelse (F1, fra klækning til 4 uger efter befrugtning (slutning af larvestadiet/begyndelse af ungfiskestadiet) fra 4 til 9 (eller 10) uger efter befrugtning (begyndelse af ungfiskestadiet til næsten fuldvoksenstadiet) og fra 9 til 15 uger efter befrugtning (næsten fuldvoksenstadiet til aflivning af voksne fisk)); vækst (F1, længde og vægt 9 og 15 uger efter befrugtning); sekundære kønskarakteristika (F1, papillære strukturer på gatfinnen 9 og 15 uger efter befrugtning); vitellogenin (F1, *vtg* mRNA eller VTG protein 15 uger efter befrugtning); fænotypisk køn (F1, via kønskirtelhistologi 15 uger efter befrugtning); reproduktion (F0 og F1, frugtbarhed og fertilitet i 21 dage); tid til gydning (F1); og histopatologi (F1, kønskirtel, lever og nyrer 15 uger efter befrugtning).
19. Valideringskriterier for testen	Opløst ilt på ≥ 60 % af luftmætningsværdien; gennemsnitlig vandtemperatur på 24-26°C under hele testen; vellykket reproduktion på ≥ 65 % hunner i kontrollen/kontrollerne; gennemsnitlig daglig frugtbarhed på ≥ 20 æg i kontrollen/kontrollerne; klækningsevne på ≥ 80 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (i hver enkelt F1 og F2); overlevelse efter klækning og indtil 3 uger efter befrugtning på ≥ 80 % (gennemsnit) og fra 3 uger efter befrugtning til aflivning for generationen på ≥ 90 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (F1), koncentrationer af testkemikaliet i opløsningen skal opretholdes tilfredsstillende inden for ± 20 % af de gennemsnitlige målte værdier.

▼**M8**

Tillæg 4

RETNINGSLINJER FOR DE TYPISKE KONTROLVÆRDIER

Det bemærkes, at disse kontrolværdier er baseret på et begrænset antal valideringsundersøgelser og kan blive ændret i lyset af de erfaringer, der indhøstes fremover.

Vækst

Vægt- og længdemålinger foretages for alle de fisk, der er udtaget til prøve 9 (eller 10) og 15 uger efter befrugtning. Hvis denne protokol følges, vil det give en forventet vådvægt 9 uger efter befrugtning på 85-145 mg for hanner og 95-150 mg for hunner. Den forventede vægt 15 uger efter befrugtning er 250-330 mg for hanner og 280-350 mg for hunner. Selv om der kan forekomme betydelige afvigelser fra disse værdier i de enkelte fisk, kan en gennemsnitsvægt i kontrolgruppen, der ligger væsentligt uden for disse intervaller, især hvis den er lavere, tyde på problemer med fodring, temperaturkontrol, vandkvalitet, sygdom eller en kombination af disse faktorer.

Klækning

En klækning i kontrolgruppen ligger typisk på omkring 90 %, men værdier så lave som 80 % er ikke usædvanlige. En klækning på under 75 % kan tyde på en utilstrækkelig bevægelse af æggene under udviklingen eller manglende omhu i håndteringen af æggene, som f.eks. manglende rettidig fjernelse af døde æg, som fører til svampeinfektion.

Overlevelse

Overlevelsesraterne frem til 3 uger efter befrugtning fra klækning og efter 3 uger efter befrugtning er normalt 90 % eller derover for kontrolgrupperne, men overlevelsesrater i de tidlige livsstadier helt ned til 80 % er ikke alarmerende. Overlevelsesrater i kontrolgrupperne på under 80 % giver anledning til bekymring og kan tyde på en utilstrækkelig rengøring af akvariet, hvilket fører til tab af larver på grund af sygdom eller kvælning på grund af lave mængder af opløst ilt. Dødelighed kan også forekomme som følge af skader i forbindelse med rengøring af beholderen og tab af larver i beholderens afløbssystem.

Vitellogeningenet

Mens de absolutte niveauer af *vitellogenin* (*vtg*) genet, udtrykt som kopier/ng af samlet mRNA, kan variere meget mellem laboratorierne på grund af de procedurer eller instrumenter, der anvendes, bør mængden af *vtg* være omkring 200 gange højere i hunner i kontrolgruppen end i hanner i kontrolgruppen. Det er ikke usædvanligt, at dette forhold er så højt som 1 000 til 2 000, men et forhold på under 200 er mistænkeligt og kan tyde på problemer med kontaminering af prøven eller problemer med den anvendte procedure og/eller de anvendte reagenser.

Sekundære kønskarakteristika

For hanner er det normale interval for sekundære kønskarakteristika, defineret som et samlet antal segmenter i papillære strukturer på gatfinnens finnestråler, på 40-80 segmenter 9-10 uger efter befrugtning. 15 uger efter befrugtning bør intervallet for hanner i kontrolgruppen være omkring 80-120 og 0 for hunner i kontrolgruppen. Af uforklarlige årsager er der i sjældne tilfælde ingen papillære strukturer 9 uger efter befrugtning, men da alle hanner i kontrolgruppen udvikler papillære strukturer 15 uger efter befrugtning, skyldes dette højst sandsynligt forsinket udvikling. Tilstedeværelsen af papillære strukturer hos hunner i kontrolgruppen tyder på, at der er XX-hanner i populationen.

▼**M8**

XX-hanner

Den normale baggrundsforekomst af XX-hanner i kulturen ser ud til at være omkring 4 % eller derunder ved 25 °C, idet forekomsten stiger med stigende vandtemperatur. Der bør tages skridt til at minimere andelen af XX-hanner i populationen. Da forekomsten af XX-hanner ser ud til at have en genetisk komponent og derfor er arvelig, er overvågning af bestanden og sikring af, at XX-hanner ikke anvendes til at opformere bestanden, en effektiv metode til at nedbringe forekomsten af XX-hanner i populationen.

Gydeaktivitet

Gydeaktiviteten i kontrolreplikaterne bør overvåges dagligt, inden der foretages en frugtbarhedsvurdering. Der kan foretages en kvalitativ visuel bedømmelse af kontrolparrene for tegn på gydeaktivitet. 12-14 uger efter befrugtning gyder de fleste kontrolpar. Et lavt antal gydende par på dette tidspunkt tyder på, at der er potentielle problemer med fiskenes sundhed, modenhed eller velfærd.

Frugtbarhed

Sunde, velfodrede japansk risfisk gyder 12-14 uger efter befrugtning normalt dagligt og producerer mellem 15 og 50 æg om dagen. Ægproduktionen for 16 af de anbefalede 24 kontrolynglepar (> 65 %) bør være mere end 20 æg pr. par om dagen og kan nå helt op på 40 æg om dagen. Et lavere antal kan tyde på umodne, underernærede eller usunde ynglepar.

Fertilitet

Procentdelen af befrugtede æg for kontrolyngleparrene er typisk i størrelsesordenen 90 %, idet endnu højere værdier ikke er usædvanlige. Fertilitetsrater på under 80 % for kontrolyngleparrene er mistænkelige og kan tyde på, at individerne er usunde, eller at forholdene ikke er optimale.

▼M8

Tillæg 5

ET EKSEMPEL PÅ EN FODRINGSPLAN

Et eksempel på en fodringsplan, der skal sikre en passende vækst og udvikling for at sikre en sund reproduktion, findes i tabel 1. Afvigelser fra fodringsplanen kan være acceptable, men det anbefales, at de testes for at kontrollere, at en acceptabel vækst og reproduktion observeres. For at følge den foreslåede fodringsplan skal tørvægten af saltsøkrebs pr. volumen flydende fødemateriale med saltsøkrebs bestemmes forud for påbegyndelse af testen. Dette kan ske ved at afveje den definerede mængde flydende fødemateriale med saltsøkrebs, der er blevet tørret i 24 timer ved 60 °C i forvejede vægtskåle. For at beregne vægten af salt i det flydende fødemateriale tørres en tilsvarende mængde af den saltopløsning, der anvendes i det flydende fødemateriale, også og trækkes fra vægten af det tørrede flydende fødemateriale med saltsøkrebs. Alternativt kan saltsøkrebsene filtreres og skylles med destilleret vand inden tørring, hvorved der ikke længere er behov for at måle vægten af »blindprøven«. Disse oplysninger anvendes til at omregne oplysningerne i tabellen fra saltsøkrebsenes tørvægt til det volumen flydende fødemateriale med saltsøkrebs, fiskene skal fodres med. Derudover anbefales det, at delprøver af flydende fødemateriale med saltsøkrebs vejes ugentligt for at kontrollere den korrekte tørvægt af de saltsøkrebs, som fiskene fodres med.

Tabel 1

Et eksempel på en fodringsplan

Tidspunkt (efter klækning)	Saltsøkrebs (mg tørvægt/fisk/dag)
Dag 1	0,5
Dag 2	0,5
Dag 3	0,6
Dag 4	0,7
Dag 5	0,8
Dag 6	1,0
Dag 7	1,3
Dag 8	1,7
Dag 9	2,2
Dag 10	2,8
Dag 11	3,5
Dag 12	4,2
Dag 13	4,5
Dag 14	4,8
Dag 15	5,2
Dag 16-21	5,6

▼**M8**

Tidspunkt (efter klækning)	Saltsøkrebs (mg tørvægt/fisk/dag)
Uge 4	7,7
Uge 5	9,0
Uge 6	11,0
Uge 7	13,5
Uge 8-aflivning	22,5

▼**M8**

Tillæg 6

EKSEMPLER PÅ ET ÆGINKUBATIONSKAMMER

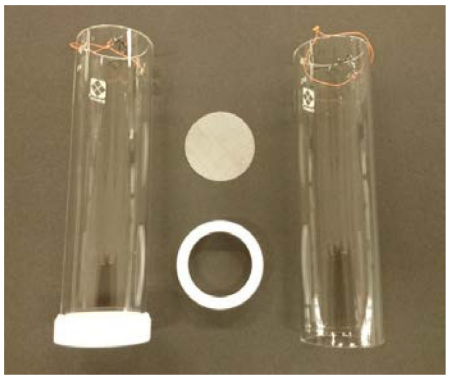
Eksempel A





Denne inkubator består af et glascentrifugeringsrør, der er overskåret på tværs, med en manchet af rustfrit stål, som holdes på plads af centrifugeringsrørets skruelåg. Et lille rør af glas eller rustfrit stål stikkes gennem låget og anbringes i nærheden af den afrundede bund og blæser forsigtigt luftbobler for at holde æggene flydende i vandet, således at overførslen af saprofytsvampe mellem æggene reduceres, samtidig med at udvekslingen af kemikaliet mellem inkubatoren og beholderen lettes.

Eksempel B



▼**M8**



Denne inkubator består af en glascylinder (5 cm i diameter og 10 cm høj) og rustfrit trådnet (0,25 φ og 32 net), der er fastgjort til bunden af cylinderen med en PTFE-ring. Inkubatorerne ophænges fra løftestangen i beholderen og rystes vertikalt (omkring 5 cm udsving) i en passende cyklus (ca. en gang hvert 4. sekund) for æg af japansk risfisk.

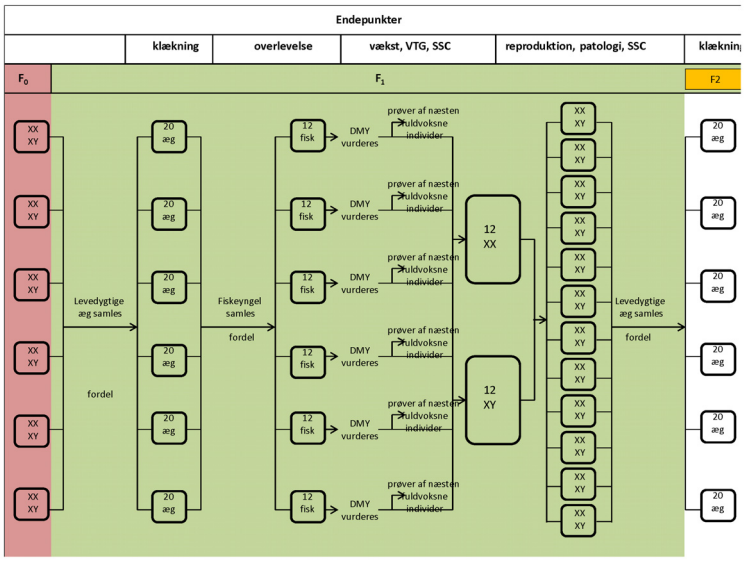
▼M8

Tillæg 7

SKEMATISK DIAGRAM OVER POOLING OG FORDELING I REPLIKATER UNDER MEOGRT-FORSØGSMETODEN

Figur 1

Pooling og omfordeling i replikater under MEOGRT. Denne figur repræsenterer en behandling eller halvdelen af en kontrol. På grund af poolingen er replikatidentiteten ikke den samme i hele testen. Bemærk at ordet »æg« henviser til levedygtige, befrugtede æg (svarende til embryoner).



Behandlinger og replikation

Forsøgsmetoden anbefaler fem testkemikaliebehandlinger, idet der anvendes materiale af teknisk kvalitet og en negativ kontrol. Antallet af replikater pr. behandling forbliver ikke konstant under hele MEOGRT, og antallet af replikater i kontrolbehandlingen er det dobbelte af en enkelt testkemikaliebehandling. I F0 har hver enkelt kemisk behandling seks replikater, mens den negative kontrolbehandling har 12 replikater. Det anbefales på det kraftigste, at der ikke anvendes opløsningsmidler, men hvis de anvendes, bør MEOGRT-rapporten indeholde en begrundelse for, hvorfor der anvendes et opløsningsmiddel, og for valget af opløsningsmiddel. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, er to typer kontroller desuden nødvendige: a) en kontrolkultur med opløsningsmiddel og b) en negativ kontrol. Disse to kontrolgrupper bør hver især bestå af et fuldt sæt af replikater på alle punkter i MEOGRT tidslinjen. Under hele udviklingen af testorganismen i F1-generationen (og F2 indtil klækning) forbliver denne replikatstruktur den samme. På det voksne stadium, hvor F1 yngleparrene sammensættes, vil det optimale være, at antallet af yngleparreplikater pr. behandling fordobles. Derfor er der op til 12 replikatpar i hver testkemikaliebehandling og 24 replikatpar i kontrolgruppen (og yderligere 24 replikatpar i kontrolkulturen med opløsningsmiddel, hvis det er relevant). Bestemmelsen af klækningen fra embryoner, der er gydet af F1-par, sker i den samme replikatstruktur som den, der blev anvendt i forbindelse med embryoner, der blev gydet af F0-par, hvilket betyder seks replikater pr. testkemikaliebehandling og 12 replikater i kontrolgruppen/kontrolgrupperne fra starten.

▼**M8**

Tillæg 8

TÆLLING AF PAPILLÆRE STRUKTURER PÅ GATFINNEN

Vigtigste materialer og reagenser

— dissektionsmikroskop (med et påsat optisk kamera)

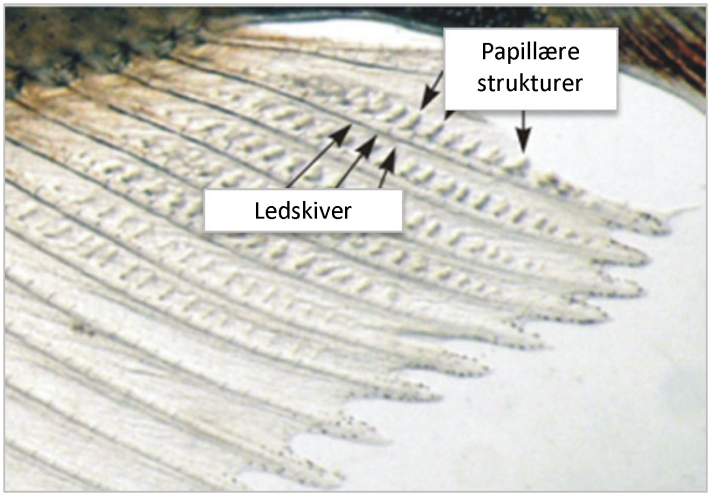
— fikseringsmiddel (f.eks. Davidson's (Bouins frarådes)), hvis der ikke tælles på grundlag af et billede.

Procedurer

Efter obduktion fotograferes gatfinnen, så papillære strukturer på gatfinnen nemt kan tælles. Selv om fotografering er den anbefalede metode, kan gatfinnen fikseres med Davidson's fikseringsmiddel eller et andet passende fikseringsmiddel i omkring 1 minut. Det er vigtigt, at gatfinnen ligger fladt under fikseringen, så papillære strukturer lettere kan tælles. Kroppen med gatfinnen kan opbevares i Davidson's fikseringsmiddel eller et andet passende fikseringsmiddel, indtil den skal analyseres. Tæl antallet af ledskiver (jf. **figur 1**) med papillære strukturer, der stikker ud fra bagkanten af ledskiven.

Figur 1

Papillære strukturer på gatfinnen



▼M8

Tillæg 9

DETALJERET TIDSLINJE FOR MEOGRT

Testuge 1-3 (F0)

F0-generationen af ynglefisk, der har opfyldt udvælgelseskriterierne (jf. punkt 16-20), eksponeres i tre uger, således at det kønscelle- og kønskirtelvæv, der er under udvikling, eksponeres for testkemikaliet. Der er et enkelt ynglepar (XX-hun-XY-han ynglepar) i hver enkelt replikatbeholder. De gydede æg indsamles og tælles, og fertiliteten vurderes i 21 på hinanden følgende dage, begyndende på testdag 1.

Testuge 4 (F0 og F1)

De befrugtede og levedygtige æg (embryoner) bør helst indsamles på en enkelt dag. Hvis der ikke er embryoner nok, kan de imidlertid indsamles over to dage. Hvis de indsamles over to dage, samles alle de embryoner, der blev indsamlet den første dag, med de embryoner, der blev indsamlet den anden dag. Derefter fordeles det samlede antal embryoner for hver behandling vilkårligt i hver af replikatinkubatorerne med 20 embryoner pr. inkubator. Dødeligheden af befrugtede æg (embryoner) kontrolleres og registreres dagligt. Døde æg fjernes fra inkubatorerne (døde befrugtede æg er særligt i de tidlige stadier kendetegnet ved et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed OECD 2010).

Bemærk: Hvis en enkelt behandling kræver indsamling på andendagen, skal alle behandlingerne (herunder kontrollerne) følge denne procedure. Hvis der efter andendagen fortsat er et utilstrækkeligt antal embryoner i en behandling til, at der kan fordeles 20 embryoner i hver inkubator, nedsættes antallet af embryoner i denne specifikke behandling til 15 embryoner pr. inkubator. Hvis der ikke er nok embryoner til at fordele 15 i hver inkubator, nedsættes antallet af replikatinkubatorer, indtil der er nok embryoner til, at der kan overføres 15 til hver enkelt inkubator. Derudover kan der indsættes flere ynglepar pr. behandling og kontrol i F0 for at producere flere æg, så man når op på de anbefalede 20 pr. replikat.

På testdag 24 aflives F0-yngleparrene humant, og deres vægt og længde registreres. F0-yngleparrene kan om nødvendigt holdes i live i yderligere 1-2 dage med henblik på genopstart af F1.

Testuge 5-6 (F1)

Indtil en til to dage før den forventede klækning standses bevægelsen af de inkuberede æg for at fremskynde klækning. Efterhånden som embryonerne klækker hver dag, samles de pr. behandling og fordeles systematisk i hver enkelt replikatlarvebeholder i en specifik behandling med højst 12 fiskeyngelindivider. Dette sker via en vilkårlig udvælgelse af fiskeyngel, hvorefter et stk. anbringes i replikater ved en tilfældig udvælgelse, idet de specifikke behandlingsreplikater inden for behandlingen gennemgås i rækkefølge, indtil alle replikater har 12 fiskeyngelindivider. Hvis der ikke er nok fiskeyngel til at fylde alle replikaterne, sikres det, at så mange replikater som muligt har 12 fiskeyngelindivider til at påbegynde F1-stadiet.

De æg, der ikke er klækket inden for to gange mediandagen for klækning i kontrollen, betragtes som ikke-levedygtige og kasseres. Antallet af fiskeyngelindivider registreres, og klækningssucces (klækningsevnen) beregnes for hvert replikat.

▼M8

Testuge 7-11 (F1)

Larvernes overlevelse kontrolleres og registreres dagligt. På testdag 43 registreres antallet af overlevende fisk i hvert replikat samt det oprindelige antal fiskeyngelindivider, der blev anbragt i replikatet (nominelt 12). Dette gør det muligt at beregne den procentuelle overlevelse fra klækning til næsten fuldvoksen.

Testuge 12 (F1)

På testdag 78-85 udtages en lille prøve af rygfinnen på hver enkelt fisk med henblik på bestemmelse af individets genotypiske køn (dvs. finneklipning). Disse oplysninger anvendes til etablering af ynglepar.

Inden for tre dage efter bestemmelsen af hver enkelt fisks genotypiske køn, etableres der vilkårligt 12 ynglepar pr. behandling og 24 par pr. kontrol. To XX- og XY-fisk fra hvert replikat udvælges vilkårligt og samles efter køn, hvorefter de vilkårligt udvælges til etablering af ynglepar (dvs. XX-XY-par). Mindst 12 replikater pr. kemisk behandling og mindst 24 replikater pr. kontrol etableres med et ynglepar pr. replikat. Hvis et replikat ikke har enten to XX- eller to XY-fisk, der kan samles, hentes der fisk med det krævede genotypekøn fra andre replikater inden for behandlingen.

De resterende fisk (maksimum 8 fisk pr. replikat) aflives humant, og der udtages prøver til bestemmelse af de forskellige endepunkter for næsten fuldvoksne individer. *Dmy* data (XX eller XY) for alle de næsten fuldvoksne individer opbevares for at sikre, at alle endepunktsdata kan relateres til hver enkelt individuel fisks genetiske køn.

Testuge 13-14 (F1)

Eksponeringen fortsætter, efterhånden som de næsten fuldvoksne ynglepar udvikler sig til fuldvoksne individer. På testdag 98 (dvs. dagen før ægindsamlingen påbegyndes) fjernes æggene fra både akvarierne og hunnerne.

Testuge 15-17 (F1)

Gydede æg indsamles dagligt i 21 på hinanden følgende dage i hvert replikat og vurderes med hensyn til frugtbarhed og fertilitet.

Testuge 18 (gentagelse af testuge 4) (F1 og F2)

På testdag 120 foretages ægindsamlingen i hver replikatbeholder om morgenen. De indsamlede æg vurderes, og de befrugtede æg (filamenterne fjernes) fra hvert enkelt ynglepar samles for hver behandling og fordeles systematisk til æginkubationskamrene med 20 befrugtede æg i hver inkubator. Inkubatorerne kan anbringes i separate »inkubatortanke«, der er etableret for hver enkelt behandling eller i den replikatbeholder, der efter klækning vil indeholde de klækkede larver. Embryonerne skal helst indsamles på en enkelt dag. Hvis der ikke er embryoner nok, kan de dog indsamles over to dage. Hvis de indsamles over to dage samles alle de embryoner i behandlingerne, der blev indsamlet den første dag, med de embryoner, der blev indsamlet den anden dag. Derefter fordeles det samlede antal embryoner for hver behandling vilkårligt i hver af replikatinkubatorerne med 20 embryoner pr. inkubator. Bemærk: Hvis en enkelt behandling kræver indsamling på andendagen, skal alle behandlingerne (herunder kontrollerne) følge denne procedure. Hvis der efter andendagen fortsat er et utilstrækkeligt antal embryoner

▼M8

i en behandling til, at der kan fordeles 20 embryoner i hver inkubator, nedsættes antallet af embryoner i denne specifikke behandling til 15 embryoner pr. inkubator. Hvis der ikke er nok embryoner til at fordele 15 i hver inkubator, nedsættes antallet af replikatinkubatorer, indtil der er nok embryoner til, at der kan overføres 15 til hver enkelt inkubator.

På testdag 121 (eller testdag 122 for at sikre, at F2 er godt påbegyndt) aflives F1-yngleparrene humant, og de analyseres for endepunkterne for voksne individer. F1-yngleparrene kan om nødvendigt holdes i live i yderligere 1-2 dage med henblik på genopstart af F2.

Testuge 19-20 (F2)

Indtil en til to dage før den forventede klækning standses bevægelsen af de inkuberede æg for at fremskynde klækning. Hvis testen afsluttes ved afslutningen af F2-klækningen, tælles fiskeynglen hver dag og kasseres. (Embryoner, der ikke er klækket efter en forlænget inkubationstid, defineret som to gange mediandagen for klækning i kontrollen, betragtes som ikke-levedygtige.)

▼M8

Tillæg 10

STATISTISK ANALYSE

De typer af biologiske data, der genereres i MEOGRT, er ikke unikke for denne, og bortset fra de patologiske data, er der udviklet mange egnede statistiske metoder til at foretage en korrekt analyse af tilsvarende data afhængigt af dataenes karakteristik, herunder normalitet, homogenitetsvarians, om undersøgelsesdesignet åbner mulighed for hypotesetestning eller regressionsanalyse, parametriske test i forhold til ikke-parametriske test osv. Generelt følger de foreslåede statistiske analyser OECD's anbefalinger vedrørende økotoksicitetsdata (OECD 2006), og et beslutningsflowdiagram for MEOGRT dataanalyse findes i figur 2.

Det antages, at datasættene oftest vil udvise monotoniresponser. Derudover bør spørgsmålet om anvendelse af en ensidet statistisk test i forhold til en tosidet statistisk test overvejes. Medmindre der findes en biologisk begrundelse for, at en ensidet test er uegnet, foreslås det, at der anvendes en ensidet test. I det følgende afsnit anbefales visse statistiske test, men hvis der udvikles mere hensigtsmæssige og/eller statistiske metoder med større styrke, som kan anvendes på de specifikke data, der genereres i MEOGRT, anvendes disse statistiske test for at udnytte disse fordele.

MEOGRT data bør analyseres separat for hvert genotypiske køn. Der findes to strategier til analysering af data fra fisk, der har skiftet køn (enten XX-hanner eller XY-hunner). 1) Alle data fra fisk, der har skiftet køn, kasseres i hele testen med undtagelse af prævalensen af kønsskifte i hvert replikat. 2) Alle data fra fisk, der har skiftet køn, bevares i datasættet og analyseres på grundlag af genotype.

Histopatologiske data

Histopatologiske data registreres som alvorsgrad, som evalueres ved hjælp af en nyligt udviklet statistisk procedure, Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al*., 2014). *Rao-Scott* justering bevarer testreplikationsoplysninger; *by Slices*-proceduren indarbejder den biologiske forventning, at alvorsgrad har tendens til at stige med stigende behandlingskoncentrationer. For hver enkelt diagnose specificerer RSCABS-resultatet, hvilke behandlinger der har en højere prævalens af patologi end kontrolgruppen, og den tilknyttede alvorsgrad.

Frugtbarhedsdata

Analyse af frugbarhedsdata består i en step-down Jonckheere-Terpstra eller Williams-test med henblik på bestemmelse af behandlingseffekterne, hvis dataene er i overensstemmelse med en monoton koncentration/respons. Med en step-down test foretages alle sammenligningerne ved et signifikansniveau på 0,05, og der foretages ingen tilpasning for antallet af foretagne sammenligninger. Dataene forventes at være overensstemmende med en monoton koncentration/respons, men dette kan kontrolleres enten ved visuel kontrol af dataene eller ved at etablere lineære og kvadratiske kontraster mellem behandlingsgennemsnit efter en rangordentransformering af dataene. Medmindre den kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, er trendtesten færdig. I modsat fald anvendes Dunnetts test til at bestemme behandlingseffekterne, hvis dataene er normalfordelt med homogen varians. Er disse krav ikke opfyldt, anvendes Dunns test med en Bonferonni-Holm justering. Alle de anførte test foretages uafhængigt af eventuelle generelle F- eller Kruskal-Wallis-test. Nærmere oplysninger findes i OECD 2006.

▼M8

Der kan anvendes alternative metoder som f.eks. en generel lineær model med Poisson errors for egg counts (uden transformering), hvis det er begrundet i statistisk henseende (Cameron og Trividi, 2013). Statistisk rådgivning anbefales, hvis der anvendes en alternativ tilgang.

Daglig ægtælling i en enkelt generation

I ANOVA-modellen er Y=Tid*Tid+Behandling + *Behandling + Tid*Behandling + *Tid*Behandling, med vilkårlige effekter i replikat (generation*behandling), og Tid*Replikat (behandling), der tager højde for uensartede varianskomponenter af begge typer mellem generationerne. Her henviser Tid til hyppigheden af ægtællingerne (f.eks. dag eller uge). Dette er en gentagen måleanalyse med korrelationer mellem observationerne i de samme replikater under hensyntagen til dataenes karakter af gentagne målinger.

Hovedeffekterne af behandlingen testes ved hjælp af Dunnetts (eller Dunnett-Hsu) test, som justerer for antallet af sammenligninger. Der er behov for justeringer for hovedeffekten af generation eller tid, for der findes ikke noget »kontrol«-niveau for disse to faktorer, og hvert niveaupar er en sammenligning af mulig interesse. For disse to hovedeffekter gælder det, at hvis F-testen for hovedeffekten er signifikant ved 0,05, kan de parvise sammenligninger af denne faktor på tværs af niveauerne testes ved 0,05 uden yderligere justering.

Modellen omfatter interaktion mellem to og tre faktorer, således at en hovedeffekt for f.eks. tid måske ikke er signifikant, selv om tid har en væsentlig indflydelse på resultaterne. Hvis en interaktion mellem to eller tre faktorer, der omfatter tid, er signifikant ved 0,05, kan sammenligninger af tidsniveauer ved 0,05 accepteres uden yderligere justering.

Dernæst kommer F-test for behandlingens signifikans inden for tidsperioden, de såkaldte »slices« i ANOVA-tabellen. Hvis f.eks. »slice« for behandling i F1 og tid 12 er signifikant ved 0,05, kan de parvise sammenligninger for behandling i F1 og tid 12 accepteres ved 0,05 uden yderligere justering. Tilsvarende erklæringer gælder for test for tid i F1 og behandling og for generation i en tidsperiode og behandling.

Når der er tale om sammenligninger, der ikke henhører under nogen af de ovenstående kategorier, bør sammenligningerne endelig justeres ved hjælp af Bonferroni-Holm-justering til p-værdier. Yderligere oplysninger om analyse af sådanne modeller kan findes i Hocking (1985) og Hochberg og Tamhane (1987).

Alternativt registreres rådataene, og de fremlægges i testrapporten som frugtbarhed (antal æg) pr. replikat/dag. Replikatgennemsnittet af rådataene bør beregnes, hvorefter der anvendes en kvadratrodstransformation. En ensidet ANOVA af de transformerede replikatgennemsnit bør beregnes efterfulgt af Dunnett-kontraster. Det kan også være en hjælp at foretage en visuel kontrol af frugtbarhedsdata for hver behandling og/eller hvert replikat med spredningsplot, der viser dataene over tid. Dette vil muliggøre en uformel vurdering af de potentielle effekter over tid.

Alle andre biologiske data

De statistiske analyser er baseret på den underliggende antagelse, at dataene med en korrekt dosisbestemmelse vil være monotone. Dataene antages således at være monotone, og de evalueres formelt for monotoni ved hjælp af lineære og kvadratiske kontraster. Hvis dataene er monotone, anbefales en Jonckheere-Terpstra trend test af replikatgennemsnit (som tilrådet i OECD 2006). Hvis den kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, anses dataene for ikke at være monotone.

▼**M8**

Hvis dataene ikke er monotone, navnlig på grund af nedsat respons ved den højeste behandling eller de to højeste behandlinger, bør det overvejes at kassere datasættet, så analysen foretages uden disse behandlinger. Denne beslutning træffes efter en faglig bedømmelse og på grundlag af alle tilgængelige data, særlig data, der indikerer åbenlys toksicitet ved disse behandlingsniveauer.

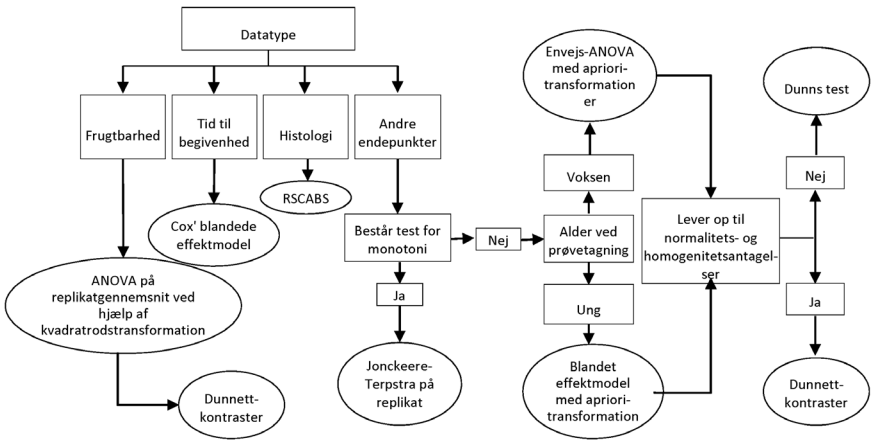
Der anbefales ingen transformationer for så vidt angår vægt og længde, selv om det til tider kan være nødvendigt. Der anbefales imidlertid en logaritmisk transformation i forbindelse med vitellogenindataene; der anbefales en kvadratrodstransformation af SSC data (papillære strukturer på gatfinnen); en arcsin-kvadratrodstransformation anbefales for data om klækningstal, procent overlevelse, kønsratio og procent befrugtede æg. Tid til klækning og tid til første gydning bør behandles som tid til hændelse-data, idet de enkelte embryoner, der ikke klækker inden for den definerede periode, eller replikater, der aldrig gydede, behandles som højrecensorerede data. Tid til klækning bør beregnes på grundlag af mediandagen for klækning i hvert replikat. Disse endepunkter bør analyseres ved hjælp af Cox' blandede effektmodel for fare (mixed-effects Cox proportional hazard model).

De biologiske data fra voksne prøver har en måling pr. replikat, dvs. der er en XX-fisk og en XY-fisk pr. replikatakvarium. Det anbefales derfor, at der foretages en envejs-ANOVA på replikatgennemsnittene. Hvis antagelserne i ANOVA (normalitet og varianshomogenitet som vurderet på grundlag af residualer i ANOVA ved henholdsvis Shapiro-Wilks-test og Levene-test) er opfyldt, bør Dunnett-kontraster anvendes til at bestemme de behandlinger, der var forskellige fra kontrollen. Hvis antagelserne i ANOVA derimod ikke er opfyldt, bør der foretages en Dunns test med henblik på at bestemme, hvilke behandlinger der var forskellige fra kontrollen. En tilsvarende procedure anbefales for data, der er angivet i procent (fertilitet, klækning og overlevelse).

De biologiske data fra næsten fuldvoksne prøver har fra 1 til 8 målinger pr. replikat, dvs. at der kan være et variabelt antal individer, der bidrager til replikatgennemsnittet for hvert genotypisk køn. Derfor anbefales det, at der anvendes en blandet ANOVA-model efterfulgt af Dunnett-kontraster, hvis antagelserne om normalitet og varianshomogenitet var opfyldt (for residualer af den blandede ANOVA-model). Hvis antagelserne derimod ikke var opfyldt, bør der foretages en Dunns test med henblik på at bestemme, hvilke behandlinger der var forskellige fra kontrollen.

Figur 2

Flowdiagram over de anbefalede statistiske procedurer for MEOGRT dataanalyse



▼**M8**

LITTERATUR

(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 og 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 og Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

C.53. **LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY (LAGDA) (ASSAY FOR AMFIBIELARVERS VÆKST OG UDVIKLING)**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning 241 (2015). Behovet for at udvikle og validere et assay, der kan identificere og karakterisere de negative konsekvenser af eksponering for giftige kemikalier hos amfibier, udspringer af bekymringer for, at kemikalieniveauerne i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv. OECD Test Guideline of the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) beskriver en toksicitetstest med en amfibieart, der ser på vækst og udvikling fra befrugtning til tidlig ungdom. Det er et assay (typisk 16 uger), der vurderer tidlig udvikling, metamorfose, overlevelse, vækst og delvis kønsmodning. Det gør det ligeledes muligt at måle en række andre endepunkter med henblik på diagnostisk evaluering af stoffer, der mistænkes for at være hormonforstyrrende, eller andre former for udviklings- og reproduktionsforstyrrende stoffer. Den metode, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, er baseret på valideringsarbejde på afrikansk sporefrø (*Xenopus laevis*) foretaget af U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) med støttearbejde udført i Japan (1). Selv om andre amfibiearter kan tilpasses en vækst- og udviklingstestprotokol, i hvilken muligheden for at bestemme det genetiske køn er en vigtig komponent, finder de specifikke metoder og observationsbaserede endepunkter i denne forsøgsmetode kun anvendelse på *Xenopus laevis*.

2. LAGDA fungerer som en efterfølgende test med en amfibieart med henblik på indsamling af mere detaljerede koncentration/responsoplysninger om negative virkninger, der er egnet til brug ved fareidentifikation og -karakterisering og ved vurdering af den økologiske risiko. Assayet stemmer overens med niveau 4 i OECD's Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters, hvor *in vivo* assays også giver data om negative virkninger på endepunkter vedrørende hormonforstyrrende virkninger (2). Det generelle testdesign indebærer, at embryoner af *X. laevis* ved Nieuwkoop and Faber (NF) stadium 8-10 (3) eksponeres for minimum fire forskellige koncentrationer af testkemikaliet (generelt fordelt på ikke under halvlogaritmiske intervaller) og kontrol/kontroller indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen med en mellemliggende delprøve ved NF stadium 62 (≤ 45 efter befrugtning; normalt omkring 45 dage (dpf)). Der er fire replikater for hver testkoncentration og otte replikater i kontrolgruppen. De endepunkter, der evalueres i løbet af eksponeringen (ved mellemliggende delprøve og slutprøve ved testens afslutning), omfatter de endepunkter, der tyder på en generel toksicitet: dødelighed, unormal adfærd og vækstdeterminanter (længde og vægt), samt endepunkter, der er udformet med henblik på karakterisering af specifikke hormonforstyrrende virkemåder, der rammer østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede fysiologiske processer. Metoden lægger primært vægt på de potentielle populationsrelevante virkninger (dvs. negative virkninger på overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion) med henblik på beregning af koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) eller en effektkoncentration, der forårsager × % ændring (ECx) i det målte endepunkt. Det skal dog bemærkes, at ECx-tilgange sjældent er egnede til større studier af denne art, hvor en forøgelse af testkoncentrationerne med henblik på bestemmelse af det ønskede ECx kan være upraktiske. Det bemærkes ligeledes, at metoden ikke dækker selve reproduktionsfasen. De definitioner, der er anvendt i denne forsøgsmetode, er anført i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. På grund af det begrænsede antal kemikalier, der testes, og det begrænsede antal laboratorier, der er involveret i valideringen af dette ret komplekse assay, er særlig forsøgsdataenes reproducerbarhed mellem laboratorier

▼M8

endnu ikke blevet dokumenteret, og det forventes, at OECD-testvejledning 241 vil blive gennemgået og om nødvendigt revideret i lyset af de indhøstede erfaringer, når der foreligger et tilstrækkeligt antal undersøgelser til, at virkningen af dette nye testdesign kan fastslås. LAGDA er et vigtigt assay i forbindelse med de potentielle bidragydere til tilbagegangen i amfibiepopulationen, idet det evaluerer virkningerne af eksponering for kemikalier i det følsomme larvestadium, hvor virkningerne på overlevelse og udvikling, herunder normal udvikling af kønsorganerne, kan påvirke populationerne i negativ retning.

4. Testen er designet til at påvise en apikal effekt/apikale effekter som følge af såvel hormonforstyrrende som ikke-hormonforstyrrende mekanismer, og omfatter diagnosticeringsendepunkter, der er delvist specifikke for centrale endokrine mekanismer. Det bemærkes, at der, indtil LAGDA blev udviklet, ikke fandtes nogen validerede assays, der opfyldte dette formål for amfibier.

5. Inden assayet påbegyndes, er det vigtigt at indhente oplysninger om testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, navnlig for at gøre det muligt at fremstille stabile kemikalieopløsninger. Det er også nødvendigt, at der findes en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kontrol af koncentrationerne af testkemikaliet. Over en periode på omkring 16 uger kræver assayet i alt 480 dyr, dvs. *X. laevis* embryoner (eller 640 embryoner, hvis der anvendes en kontrolkultur med opløsningsmiddel) for at sikre, at testen har en tilstrækkelig styrke med hensyn til evaluering af populationsrelevante endepunkter såsom vækst, udvikling og kønsmodning.

6. Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovmæssige formål. Desuden vurderer dette assay ikke frugtbarheden direkte, så det kan måske ikke anvendes på et højere niveau end niveau 4 i OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters).

VIDENSKABELIGT GRUNDLAG FOR FORSØGSMETODEN

7. En stor del af vores nuværende forståelse af amfibiers biologi er indhøstet ved hjælp af laboratoriemodelarten *X. laevis.* Denne art kan rutinemæssigt opdrættes i laboratorier, ovulationen kan induceres ved hjælp af human choriongonadotrophin (hCG), og forsøgsdyrene kan nemt anskaffes fra kommercielle avlere.

8. Som hos alle andre hvirveldyr styres amfibiers reproduktion af hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen (HPG) (4). Østrogener og androgener er mediatorer i det endokrine system og styrer udviklingen og fysiologien af seksuel dimorfisme. Der findes tre særskilte stadier i amfibiers livscyklus, hvor denne akse er særligt aktiv: (1) differentiering af kønskirtelanlæg på larveudviklingsstadiet, (2) udvikling af sekundære kønskarakteristika og modning af kønskirtler i ungdomsstadiet og (3) voksnes funktionelle reproduktion. Hvert af disse tre udviklingsvinduer vil kunne være udsat for hormonforstyrrelser fra visse kemikalier såsom østrogener og androgener, hvilket i sidste ende fører til tab af organismernes yngleevne.

9. Udviklingen af kønskirtlerne starter ved NF stadium 43, hvor den urogenitale kam først udvikles. Differentiering af kønskirtelanlæg starter ved NF stadium 52, hvor de primordiale germinalceller enten vandrer til medullært væv (hanner) eller forbliver i det kortikale område (hunner) af kønskirtelvævet

▼M8

under udvikling (3). Denne seksuelle differentieringsproces af kønskirtlerne blev først rapporteret som værende følsom over for kemiske ændringer hos *Xenopus* i 1950'erne (5) (6). Eksponering af haletudser for østradiol i denne periode af differentieringen af kønskirtelanlæggene resulterer i kønsskifte hos hannerne, som, når de er fuldt udvoksede, er fuldt funktionsdygtigehunner (7) (8). Et funktionelt kønsskifte af hunner til hanner er også muligt og er blevet rapporteret efter implantation af testisvæv i haletudser (9). Selv om eksponering for en aromatasehæmmer også forårsager et funktionelt kønsskifte hos *X. tropicalis* (10), har dette imidlertid ikke vist sig at være tilfældet hos *X. laevis*. Historisk set er de toksiske effekter på differentieringen af kønskirtelanlæg blevet bedømt på grundlag af vævsundersøgelser af kønskirtler ved metamorfose, og kønsskifte kunne kun bestemmes via en analyse af kønsfordelingen. Indtil for nylig fandtes der ingen metoder til direkte bestemmelse af det genetiske køn hos *Xenopus*. Påvisningen for nylig af markører for køn hos *X. laevis* gør det imidlertid muligt at bestemme det genetiske køn, ligesom en direkte identifikation af dyr, der har skiftet køn, er blevet mulig (11).

10. Hos hanner fortsætter udviklingen, efterhånden som testosteronniveauet i blodet stiger med udviklingen af de sekundære kønskarakteristika og udviklingen af testis. Hos hunner produceres østradiol i æggestokkene, hvilket resulterer i fremkomsten af vitellogenin (VTG) i plasmaet, vitellogenin oocyter i æggestokkene og udviklingen af æggeledere (12). Æggelederne er hunnens sekundære kønskarakteristika, der spiller en rolle i oocytmodningen i reproduktionsfasen. Der lægges et gelelag på oocytterne, når de passerer gennem æggelederen og samles i en ægsæk klar til befrugtning. Udviklingen af æggeledere ser ud til at være reguleret af østrogener, da udviklingen er sammenfaldende med østradiolniveauet i blodet hos *X. laevis* (13) og *X. tropicalis* (12). Der er rapporteret om udvikling af æggeledere hos hanner efter eksponering for polyklorerede biphenyler (14) og 4-*tert*-octylphenol (15).

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testdesignet indebærer, at *X. laevis* embryoner ved NF stadium 8-10 via vandet eksponeres for fire forskellige koncentrationer af testkemikaliet og kontroller indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen med en mellemliggende delprøve ved NF stadium 62. Selv om det også er en mulighed at dosere yderst hydrofobe kemikalier via foderet, foreligger der indtil videre kun få erfaringer med denne eksponeringsvej i dette assay. Der er fire replikater for hver testkoncentration og otte replikater for hver kontrol, der anvendes. De endepunkter, der evalueres i løbet af eksponeringen, omfatter de endepunkter, der tyder på en generel toksicitet (dvs. dødelighed, unormal adfærd og vækstdeterminanter (længde og vægt), samt endepunkter, der er udformet med henblik på karakterisering af specifikke hormonforstyrrende virkemåder, der rammer østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede fysiologiske processer (f.eks. skjoldbruskkirtelhistopatologi, kønskirtelhistopatologi og ægge- og sædlederhistopatologi, unormal udvikling, plasmavitellogenin (valgfrit) og kønsfordelingen mellem genotype/fænotype).

VALIDERINGSKRITERIER FOR TESTEN

12. Følgende kriterier for testens gyldighed finder anvendelse:

— Koncentrationen af opløst ilt skal være ≥ 40 % af luftmætningsværdien under hele testen.

▼M8

— Vandtemperaturen skal ligge på 21 ± 1 °C, og forskellene mellem replikater og behandlinger må ikke overstige 1,0 °C.

— Testopløsningens pH skal holdes på mellem 6,5 og 8,5, og forskellen mellem replikater og behandlinger må ikke overstige 0,5.

— Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

— Dødeligheden i eksponeringsperioden skal være ≤ 20 % i hvert replikat i kontrollerne.

— ≥ 70 % levedygtighed i den yngel, der udvælges til opstart af testen.

— Mediantiden til NF stadium 62 i kontrollerne skal være ≤ 45 dage.

— Testorganismernes gennemsnitsvægt ved NF stadium 62 og ved afslutningen af assayet i kontrollerne og kontrolkulturerne med opløsningsmiddel (hvis relevant) skal nå op på henholdsvis 1,0 ± 0,2 og 11,5 ± 3 g.

13. Selv om det ikke er et validitetskriterium, anbefales det, at mindst tre behandlingsniveauer med tre ukompromitterede replikater er tilgængelige for analyse. For høj dødelighed, der kompromitterer en behandling, defineres som > 4 døde (> 20 %) i to eller flere replikater, der ikke kan forklares ved en teknisk fejl. Mindst tre behandlingsniveauer uden åbenlys toksicitet bør være tilgængelige for analyse. Abnorm adfærd omfatter f.eks. at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli, morfologiske abnormaliteter (*f.eks.* misdannelse af lemmer), hæmoragiske læsioner og ødemer på maven.

14. Hvis der observeres en afvigelse fra validitetskriterierne for testen, bør konsekvenserne holdes op imod forsøgsresultaternes pålidelighed, og disse afvigelser og overvejelser bør fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF METODERNE

Apparatur

15. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

a) temperaturkontrolapparater (f.eks. varme- eller køleanordninger (justerbar til 21 °C ± 1 °C)

▼M8

b) termometer

c) binokulært dissektionsmikroskop og dissektionsredskaber

d) digitalkamera med en opløsning på mindst 4 megapixel og mikrofunktion (hvis nødvendigt)

e) analysevægt, der kan måle ned til 0,001 mg eller 1 µg

f) oxygenmeter og pH-meter

g) lysintensitetsmåler til måling i lux-enheder.

Vand

Kilde og kvalitet

16. Der kan anvendes lokalt tilgængeligt fortyndingsvand (f.eks. kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand), som muliggør normal vækst og udvikling af *X. laevis*-haletudser, og der skal foreligge data om normal vækst i dette vand. Da den lokale vandkvalitet kan variere betydeligt fra det ene område til det andet, bør vandkvaliteten analyseres, især hvis der ikke foreligger historiske data om, hvorvidt vandet kan bruges til at opdrætte larver af amfibier. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca*2*+, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO^{4}4_{2-}$), pesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer skal foretages før påbegyndelse af testen og/eller f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Iodidkoncentrationen i testvandet

17. For at få skjoldbruskkirtlen til at syntetisere TH til at understøtte en normal metamorfose skal der være tilstrækkeligt iodid tilgængelig for larverne gennem en kombination af vandige kilder og foderkilder. I øjeblikket er der ingen empirisk afledte retningslinjer for minimumsiodidkoncentrationer i foder eller vand for at sikre en ordentlig udvikling. Iodidtilgængelighed kan dog påvirke skjoldbruskkirtelsystemets modtagelighed for thyreoideaaktive agenser og er kendt for at modulere skjoldbruskkirtlens basale aktivitet, som fortjener opmærksomhed ved fortolkning af resultaterne fra den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. På grundlag af tidligere arbejde har assayet vist sig at fungere godt, når iodidkoncentrationerne (I^{-}) i fortyndingsvandet ligger mellem 0,5 og 10 µg/l. Ideelt bør minimumsiodidkoncentrationen i fortyndingsvandet ligge på 0,5 µg/l under hele testen (tilsat som natrium- eller kaliumsalt). Hvis testvandet rekonstitueres på grundlag af demineraliseret vand, tilsættes iodid ved en minimumskoncentration på 0,5 µg/l. En eventuel tilsætning af iodid eller andre salte til testvandet (dvs. fortyndingsvandet) anføres i rapporten. Iodidindholdet kan også måles i foderet ud over i testvandet.

Eksponeringssystem

18. Testen blev udviklet ved hjælp af et gennemstrømningsfortyndersystem. De af systemets komponenter, der har vandkontakt, bør være af glas, rustfrit stål og/eller andre kemisk inerte materialer. Eksponeringsbeholderne bør være akvarier af glas eller rustfrit stål, som har et beholdervolumen på ca. 4,0-10,0 l (vanddybde på minimum 10-15 cm). Systemet bør kunne bære alle eksponeringskoncentrationer, en kontrol og en kontrolkultur med opløsningsmiddel, hvis det er relevant, med fire replikater pr. behandling og otte i kontrollerne. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være

▼M8

konstant (*f.eks.* mindst 5 udskiftninger af hele beholderen pr. dag) for at undgå et fald i den kemiske koncentration på grund af både testorganismernes og de vandlevende mikroorganismers stofskifte eller abiotiske nedbrydningsveje (hydrolyse, fotolyse) eller spredning (fordampning, sorption). Behandlingsbeholderne placeres vilkårligt i eksponeringssystemet med henblik på at reducere potentielle virkninger af placeringen, bl.a. mindre variationer i temperatur, lysintensitet *osv.* For yderligere oplysninger om opsætning af gennemstrømningseksponeringssystemer henvises til ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity test on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (16).

Kemikalietilførsel: fremstilling af testopløsninger

19. Til fremstilling af testopløsningerne i eksponeringssystemet doseres stamopløsningen af testkemikaliet til eksponeringssystemet ved hjælp af en egnet pumpe eller et andet apparat. Stamopløsningens flowrate bør kalibreres i overensstemmelse med den analytiske bekræftelse af testopløsningerne før påbegyndelse af eksponeringen, og den kontrolleres regelmæssigt via volumenmåling under testen. Testopløsningen i hvert kammer bør fornys med minimum 5 volumenfornyelser/dag.

20. Den anvendte metode til at indføre testkemikaliet i systemet kan variere alt efter dets fysisk-kemiske egenskaber. Før denne test benyttes, bør der derfor indhentes relevante basisoplysninger om kemikaliet for at afgøre testbarheden. Nyttige oplysninger om testkemikaliespecifikke egenskaber omfatter strukturformlen, molekylvægt, renhed, vand- og lysstabilitet, pKa og Kow, vandopløselighed (helst i testmediet) og damptryk samt resultaterne af en bestemmelse af let bionedbrydelighed (forsøgsmetode C.4 (17) eller C.29 (18)). Opløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forekomme et tab som følge af fordampning af testkemikaliet. Foreligger ovennævnte oplysninger ikke, bør det overvejes nøje, om testen skal foretages, da testdesignet vil afhænge af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, og uden disse data kan testresultaterne være vanskelige at fortolke eller meningsløse. En pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet i testopløsningerne med kendt og publiceret nøjagtighed og detektionsgrænse bør foreligge. Vandopløselige kemikalier kan opløses i delprøver af fortyndingsvandet ved en koncentration, der giver mulighed for tilførsel ved måltestkoncentrationen i et gennemstrømningssystem. Kemikalier, der er flydende eller faste ved rumtemperatur og moderat opløselige i vand, kræver eventuelt brug af væske:væske eller væske:fast stof (*f.eks.* mætningskolonner med glasuld) mætningssystem (19). Selv om det også er en mulighed at dosere meget hydrofobe testkemikalier via foderet, foreligger der indtil videre kun få erfaringer med den eksponeringsvej i dette assay.

21. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved en simpel mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydsbehandling). Mætningssøjler/-systemer eller passive doseringsmetoder (20) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen. Der skal helst benyttes et testsystem uden hjælpeopløsningsmidler. Forskellige testkemikalier vil dog have forskellige fysisk-kemiske egenskaber, der sandsynligvis vil kræve forskellige tilgange til fremstilling af vand til kemikalieeksponering. Det bør tilstræbes at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: (1) visse opløsningsmidler selv kan

▼M8

føre til toksicitet og/eller uønskede eller uventede reaktioner, (2) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker ved brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, (3) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm som følge af mikrobiel aktivitet, som kan påvirke miljøforholdene og muligheden for at opretholde eksponeringskoncentrationer, og (4) i fravær af historiske data, der viser, at opløsningsmidlet ikke påvirker resultatet af undersøgelsen, kræver brugen af opløsningsmidler en behandling af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, der har dyrevelfærdsmæssige konsekvenser, da der kræves flere dyr for at udføre testen. For kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (21), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af testkemikaliets kemiske egenskaber og tilgængeligheden af historiske kontroldata om brugen af opløsningsmidlet. Foreligger der ikke historiske data, bestemmes opløsningsmidlets egnethed før gennemførelsen af den endelige undersøgelse. Hvis brug af et opløsningsmiddel er uundgåelig, og mikrobiologisk aktivitet (biofilmdannelse) forekommer, anbefales det, at biofilmdannelsen i de enkelte tanke registreres/rapporteres (mindst ugentligt) under hele testforløbet. Ideelt bør opløsningsmiddelkoncentrationen holdes konstant i kontrolkulturen med opløsningsmiddel og i alle testbehandlingerne. Hvis koncentrationen af opløsningsmidlet ikke holdes konstant, bør den højeste koncentration af opløsningsmidlet i forsøgsbehandlingen anvendes i kontrolkulturen med opløsningsmiddel. I tilfælde, hvor der anvendes et opløsningsmiddelbærestof, bør de maksimale opløsningsmiddelkoncentrationer ikke overstige 100 µl/l eller 100 mg/l (21), og det anbefales, at opløsningsmiddelkoncentrationen holdes så lav som muligt (*f.eks.* ≦ 20 µl/l) for at undgå, at opløsningsmidlet potentielt påvirker de målte endepunkter (22).

Forsøgsdyr

Testarter

22. Testarten er *X. laevis*, fordi den: (1) den dyrkes rutinemæssigt i laboratorier over hele verden, (2) den kan let fås fra kommercielle leverandører, og (3) dens genetiske køn kan bestemmes.

Pasning af voksne og avl

23. Den hensigtsmæssige pasning og avl af *X. laevis* er beskrevet i standardretningslinjer (23). Hold og pasning af *X. laevis* er også beskrevet af Read (24). For at inducere yngleadfærd injiceres 3-5 par voksne hunner og hanner med humant choriongonadotropin (hCG). Hunner og hanner injiceres med henholdsvis ca. 800 IU-1 000 IU og 500 IU-800 IU hCG opløst i en 0,6-0,9 % saltvandsopløsning eller Ringers væske til frøer, en isotonisk saltopløsning tilbrug til amfibier). Den injicerede mængde bør være omkring 10 µl/g kropsvægt (~1 000 µl). Ynglende par holdes uforstyrrede og under statiske betingelser i store beholdere for at fremme amplexus. Bunden af hver ynglebeholder bør have en falsk bund af rustfrit stål eller plastvæv, så æggemasserne kan falde ned i beholderens bund. Frøer, som injiceres sidst på eftermiddagen, vil normalt lægge de fleste af deres æg midt på den følgende formiddag. Efter at en tilstrækkelig mængde æg er frigivet og befrugtet, fjernes de voksne dyr fra ynglebeholderne. Derefter indsamles æggene, og gelélaget fjernes ved hjælp af L-cysteinbehandling (23). Der fremstilles en 2 % L-cysteinopløsning, og pH justeres til 8,1 med 1 M NaOH. Denne 21 °C-opløsning tilføjes til en 500 ml Erlenmeyer kolbe indeholdende æggene fra en enkelt gydning og slynges forsigtigt rundt i et

▼M8

til to minutter, hvorefter der skylles grundigt 6-8 gange med 21 °C dyrkningsvand. Æggene overføres dernæst til en krystalliseringsskål og bestemmes til at være > 70 % levedygtige med minimale abnormaliteter på embryoner, der fremviser celledeling.

TESTDESIGN

Testkoncentrationer

24. Det anbefales, at der anvendes minimum fire kemiske koncentrationer og passende kontroller (herunder kontrolkulturer med opløsningsmiddel, hvis det er relevant). Generelt anbefales en koncentrationsadskillelse (afstandsfaktor), der ikke overstiger 3,2.

25. Med henblik på denne test anvendes resultaterne fra eksisterende amfibieundersøgelser til så vidt muligt at bestemme den højeste testkoncentration for at undgå koncentrationer, der er åbenlyst toksiske. Information fra f.eks. kvantitative relationer mellem struktur og aktivitet (QSAR), analogislutninger og data fra eksisterende amfibieundersøgelser såsom Amphibian Metamorphosis Assay, forsøgsmetode C.38 (25) og Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (23) og/eller fisketest såsom forsøgsmetoderne C.48, C.41 og C.49 (26) (27) (28) kan bidrage til fastsættelsen af denne koncentration. Forud for gennemførelsen af LAGDA kan der gennemføres et forsøg til bestemmelse af dosisinterval. Det anbefales, at eksponeringen til bestemmelse af dosisinterval indledes inden for 24 timer efter befrugtningen og fortsættes i 7-14 dage (eller mere, hvis det er nødvendigt), og testkoncentrationerne fastsættes således, at intervallerne mellem testkoncentrationerne ikke er større end en faktor 10. Resultaterne af forsøget til bestemmelse af dosisinterval bør bruges til at fastsætte den højeste koncentration i LAGDA. Bemærk, at såfremt der er blevet anvendt et opløsningsmiddel, kan opløsningsmidlets egnethed (dvs. om det kan have en indvirkning på resultatet af undersøgelsen) bestemmes som en del af undersøgelsen til bestemmelse af dosisinterval.

Replikater inden for behandlingsgrupper og kontroller

26. Der bør anvendes minimum fire replikater pr. testkoncentration og minimum otte replikater til kontroller (og kontrolkultur med opløsningsmiddel, hvis det er relevant) (dvs. antallet af replikater i kontrollen og en eventuel kontrolkultur med opløsningsmiddel bør være dobbelt så højt som antallet af replikater i hver enkelt behandlingsgruppe for at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke). Hvert replikat bør højst indeholde 20 dyr. Minimumsantallet af anvendte dyr er 15 (5 til NF stadium 62-delprøven og 10 unge individer). Der sættes dog ekstra dyr i hvert replikat for at tage hensyn til muligheden for dødelighed, således at det kritiske antal på 15 opretholdes.

FREMGANGSMÅDE

Oversigt over assayet

27. Assayet startes med nyligt gydede embryoner (NF stadium 8-10) og fortsætter indtil udviklingen af unge individer. Dyrene undersøges dagligt for dødelighed og eventuelle tegn på unormal adfærd. Ved NF stadium 62 indsamles en larvedelprøve (op til 5 dyr pr. replikat), og forskellige endepunkter undersøges (tabel 1). Når alle dyrene har nået NF stadium 66, dvs. afslutning af metamorfosen (eller efter 70 dage fra starten af assayet, hvad der måtte komme først), foretages der en vilkårlig udvælgelse (men uden

▼M8

delprøveudtagelse) for at nedbringe antallet af dyr (10 pr. beholder) (jf. punkt 43), og de resterende dyr eksponeres indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen. Ved testens afslutning (udtagelse af prøver af unge individer) foretages der yderligere målinger (tabel 1).

Eksponeringsbetingelser

28. Et fuldstændigt sammendrag af testparametre findes i tillæg 3. Under eksponeringsperioden måles opløst ilt, temperatur og pH-værdien i testopløsningerne dagligt. Ledningsevne, alkalinitet og hårdhed måles en gang månedligt. Forskellene i vandtemperaturen i testopløsningerne mellem replikater og mellem behandlinger (på en dag) bør ikke overstige 1,0 °C. Forskellene i testopløsningernes pH-værdi mellem replikater og mellem behandlinger bør ikke overstige 0,5.

29. Eksponeringsbeholderne kan suges rene dagligt for at fjerne uspist foder og affaldsprodukter, idet krydskontaminering af beholderne undgås. Det bør sikres, at stress og traumer for dyrene minimeres, især under flytning, rensning af akvarier og håndtering. Belastende betingelser/aktiviteter bør undgås, såsom høj og/eller uophørlig støj, bankning på akvariet, vibrationer i akvariet.

Varighed af eksponeringen for testkemikaliet

30. Eksponeringen indledes med nyligt gydede embryoner (NF stadium 8-10) og fortsættes indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 (≤ 45 dage fra påbegyndelsen af assayet) i kontrolgruppen. Generelt er varigheden af LAGDA 16 uger (maksimalt 17 uger).

Indledning af assayet

31. Det skal på forhånd påvises, at de forældredyr, der anvendes til indledning af assayet, kan producere afkom, hvis genetiske køn kan bestemmes (tillæg 5). Efter gydning indsamles embryonerne, de cysteinbehandles for at fjerne gelélaget og screenes for levedygtighed (23). Cysteinbehandling gør det muligt at håndtere embryonerne under screeningen, uden at de klistrer til overflader. Screeningen foretages under et dissektionsmikroskop ved hjælp af en dråbepipette af passende størrelse til fjernelse af ikke levedygtige embryoner. Det foretrækkes, at en enkelt gydning, der resulterer i en levedygtighed på over 70 %, anvendes til testen. Embryoner ved NF stadium 8-10 fordeles vilkårligt i eksponeringsbehandlingsbeholdere indeholdende en passende mængde fortyndingsvand, indtil hver beholder indeholder 20 embryoner. Embryonerne håndteres forsigtigt under denne overførsel for at minimere håndteringsstress og undgå skader. 96 timer efter befrugtningen bør haletudserne have bevæget sig op i vandsøjlen og være begyndt at sætte sig fast på beholderens sider.

Fodring

32. Ændring af foder og fodring i de forskellige livsstadier for *X. laevis* er et meget vigtigt aspekt af LAGDA-protokollen. Overfodring på larvestadiet resulterer typisk i øget forekomst og mere alvorlige tilfælde af scoliose (tillæg 8) og bør undgås. Omvendt resulterer en utilstrækkelig fodring på larvestadiet i meget variable udviklingsrater blandt kontrollerne, hvilket

▼M8

potentielt kompromitterer den statistiske styrke eller konfunderer testresultaterne. Tillæg 4 indeholder anbefalinger om foder til og fodring af larver og unge individer af *X. laevis* under gennemstrømningsforhold, men alternativer er tilladt, forudsat at testorganismerne vokser og udvikler sig tilfredsstillende. Det er vigtigt at bemærke, at foderet ikke må indeholde endokrinaktive stoffer såsom sojamel, såfremt der måles endokrinspecifikke endepunkter.

Larvefodring

33. Det anbefalede larvefoder består af ørredstartfoder, *Spirulina* algevafler og guldfiskefoder (*f.eks.* TetraFin® flakes, Tetra, Tyskland) blandet sammen i dyrkningsvand (eller fortyndingsvand). Blandingen gives tre gange dagligt på hverdage og en gang dagligt i weekender. Haletudserne fodres også med levende saltsøkrebs, *Artemia* spp., 24-timer gamle nauplii, to gange dagligt på hverdage og en gang dagligt i weekender begyndende på dag 8 efter befrugtningen. Larvefodringen, der bør være konsekvent i hver testbeholder, bør muliggøre en passende vækst og udvikling af forsøgsdyrene for at sikre reproducerbarhed og overførbarhed af assayresultaterne: (1) Mediantiden til NF stadium 62 i kontrollerne bør være ≤ 45 dage, og (2) en gennemsnitsvægt inden for 1,0 ± 0,2 g ved NF stadium 62 i kontrollerne anbefales.

Fodring af unge individer

34. Når metamorfosen er tilendebragt, består fodringen af synkende foder til frøer af høj kvalitet, f.eks. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (tillæg 4). Til helt unge frøer males pillerne kortvarigt i en kaffekværn eller blender eller knuses i en morter for at gøre dem mindre. Når de unge frøer er store nok til at spise hele piller, er det ikke længere nødvendigt at male eller knuse dem. Dyrene bør fodres en gang dagligt. Fodringen af de unge frøer bør muliggøre en passende vækst og udvikling af organismerne: Det anbefales, at unge frøer i kontrolgruppen har en gennemsnitsvægt på 11,5 ± 3 g ved afslutningen af assayet.

Analytisk kemi

35. Før assayet påbegyndes, bør testkemikaliets stabilitet (*f.eks*. opløselighed, nedbrydelighed og flygtighed) og alle analysemetoderne klarlægges, *f.eks.* ved hjælp af eksisterende information eller viden. Når doseringen foretages via fortyndingsvandet, anbefales det, at testopløsningerne fra hver enkelt replikatbeholder analyseres før påbegyndelsen af testen for at efterprøve systemets effektivitet. I løbet af eksponeringsperioden bestemmes koncentrationerne af testkemikaliet med passende intervaller, helst en gang om ugen i mindst et replikat i hver behandlingsgruppe, idet der skiftes mellem replikaterne inden for den samme behandlingsgruppe hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration under hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier. Variationskoefficienten (CV) for de målte testkoncentrationer under hele testforløbet i en behandling bør holdes på 20 % eller derunder i hver koncentration. Når de målte koncentrationer ikke ligger inden for 80-120 % af den nominelle koncentration (f.eks. når meget bionedbrydelige eller adsorptive kemikalier testes), bør effektkoncentrationerne bestemmes og udtrykkes i forhold til den aritmetiske gennemsnitskoncentration for gennemstrømningstest.

▼M8

36. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder kontrolleres regelmæssigt (*f.eks.* tre gange ugentligt) under eksponeringen. Hvis kemikalier ikke kan påvises ved nogle eller alle de nominelle koncentrationer (*f.eks*. på grund af hurtig nedbrydning eller adsorption i testbeholderne eller ved en markant ophobning af kemikalier i de eksponerede dyr), anbefales det, at udskiftningen af testopløsningen i hvert kammer tilpasses for at holde testkoncentrationerne så konstante som muligt.

Observationer og endepunktsmålinger

37. De endepunkter, der evalueres under eksponeringen, er de endepunkter, der viser toksicitet, herunder dødelighed, unormal adfærd såsom kliniske sygdomstegn og/eller generel toksicitet, og vækstdeterminanter (længde og vægt) samt patologiske endepunkter, der kan reagere på både generel toksicitet og endokrine virkemåder, der påvirker østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede reaktionsveje. Derudover er det valgfrit, om man ønsker at måle VTG-koncentrationen i plasma ved afslutningen af assayet. Måling af VTG kan være nyttig for forståelsen af undersøgelsesresultaterne i forbindelse med de endokrine mekanismer for stoffer, der mistænkes for at være hormonforstyrrende. Endepunkter og timingen af målingerne er opstillet i tabel 1.

Tabel 1

Endepunktsoversigt for LAGDA

Endepunkter (*)	Dagligt	Mellemliggende prøvetagning (Larveprøvetagning)	Testafslutning (Prøveudtagning af unge individer)
Dødelighed og abnormiteter	X		
Tid til NF stadium 62		X	
Histo(pato)logi (skjoldbruskkirtlen)		X	
Morfometri (vægt- og længdetilvækst)		X	X
Lever-somatisk indeks (LSI)			X
Genetisk/fænotypisk kønsfordeling			X
Histopatologi (kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever)			X
Vitellogenin (VTG) (valgfrit)			X

(*) Alle endepunkter analyseres statistisk.

Dødelighed og daglige observationer

38. Alle testbeholdere kontrolleres dagligt for døde dyr, og dødeligheden registreres for hver beholder. Døde dyr fjernes fra testbeholderen, så snart de observeres. De døde dyrs udviklingsstadium kategoriseres enten som præ-NF stadium 58 (præ-forlemmefremkomst), NF stadium 58-NF stadium 62, NF stadium 63-NF stadium 66 (mellem NF stadium 62 og fuldstændig haleabsorption), eller post-NF stadium 66 (post-larvestadium). En dødelighed på

▼M8

over 20 % kan tyde på uhensigtsmæssige testbetingelser eller åbenlyst toksiske virkninger af testkemikaliet. Dyrene har tendens til at være mest følsomme over for ikke-kemisk induceret dødelighed i de første dage af udviklingen efter gydningen og på højdepunktet af metamorfosen. En sådan dødelighed kan fremgå af kontroldataene.

39. Derudover bør eventuelle observationer af unormal adfærd, grove misdannelser (*f.eks.* scoliose) eller skader registreres. Observationer af scoliose bør tælles (incidens) og inddeles efter alvorsgrad (*f.eks.* ikke markant – NR, minimal – 1, moderat – 2, alvorlig – 3; tillæg 8). Det bør tilstræbes, at prævalensen af moderat og alvorlig scoliose begrænses (*f.eks.* under 10 % i kontrollerne) under hele undersøgelsen, selv om en højere prævalens af abnormiteter i kontrolgruppen ikke nødvendigvis er en begrundelse for at indstille testen. Normal adfærd for larver er kendetegnet ved, at de hænger i vandsøjlen med halen hævet over hovedet, slår regelmæssigt og rytmisk med halefinnen, jævnligt kommer op til overfladen for at ånde og reagerer på stimuli. Abnorm adfærd omfatter f.eks. at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli. For dyr i post-metamorfosestadiet skal der ud over ovennævnte abnorme adfærd registreres forskelle i foderindtaget mellem behandlinger. Grove misdannelser og læsioner kan omfatte morfologiske abnormiteter (f.eks. misdannelse af lemmer), hæmoragiske læsioner, ødemer på maven, bakterie- eller svampeinfektioner for blot at nævne nogle få. Forekomsten af skader på hovedet af unge individer, lige bag ved næseborene kan være et tegn på utilstrækkelig fugtighed. Disse bestemmelser er kvalitative og anses for at svare til kliniske tegn på sygdom/stress og foretages ved sammenligning med kontroldyr. Hvis forekomsten er større i eksponerede beholdere end i kontrollerne, betragtes disse som bevis for åbenlys toksicitet.

Delprøvetagning af larver

Oversigt over delprøvetagning af larver:

40. Haletudser, der har nået NF stadium 62, bør fjernes fra beholderne og enten udtages til prøve eller flyttes til den næste del af eksponeringen i en ny beholder, eller fysisk adskilles fra de resterende haletudser i samme tank med en deleanordning. Haletudserne kontrolleres dagligt, og den undersøgelsesdag, hvor de enkelte haletudser når NF stadium 62, registreres. Det bestemmende kendetegn, der bruges i denne vurdering, er hovedets form. Når hovedet er blevet så meget mindre, at det visuelt har omtrent samme bredde som haletudsens krop, og forlemmerne befinder sig midt ud for hjertet, anses det pågældende individ for at have nået NF stadium 62.

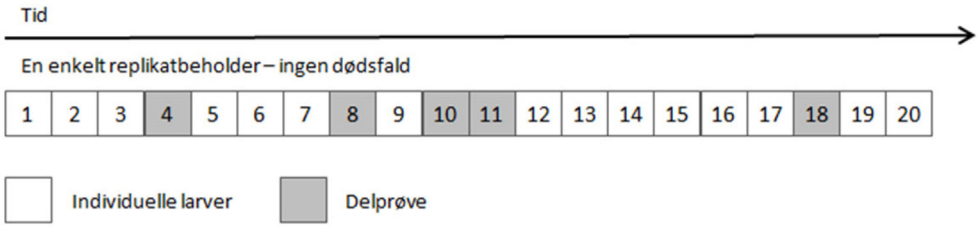
41. Målet er at udtage en prøve på i alt fem haletudser i NF stadium 62 pr. replikatbeholder. Dette bør ske fuldstændig tilfældigt, men bestemmes *på forhånd*. Et hypotetisk eksempel på en replikatbeholder findes i **figur 1**. Hvis der er 20 overlevende haletudser i en beholder, når det første individ når NF stadium 62, udvælges fem tilfældige haletudser blandt nr. 1-20. Haletudse nr. 1 er det første individ, der når NF stadium 62, og haletudse nr. 20 er det sidste individ i beholderen, der når NF stadium 62. Hvis der er 18 overlevende larver i en beholder, bør de fem tilfældige larver ligeledes udvælges blandt nr. 1-18. Denne handling bør udføres for hver replikatbeholder, når det første individ når NF stadium 62. Hvis der er dødelighed ved NF stadium 62-prøvetagningen, skal de resterende prøver genrandomiseres på grundlag af det resterende antal larver < NF stadium 62 og det antal prøver, der er nødvendigt for at nå op på i alt fem prøver fra det pågældende replikat. Den dag, en haletudse når NF stadium 62, sammenlignes med det på forhånd udarbejdede skema for at bestemme, om det pågældende individ

▼M8

skal udtages til prøve eller fysisk adskilles fra de resterende haletudser med henblik på fortsat eksponering. I det angivne eksempel (figur 1) adskilles det individ, der først når NF stadium 62 (dvs. boks nr. 1) fysisk fra de øvrige larver, eksponeringen fortsættes, og den undersøgelsesdag, hvor det pågældende individ nåede NF stadium 62, registreres. Efterfølgende behandles individ nr. 2 og nr. 3 på samme måde som individ nr. 1, hvorefter individ nr. 4 udtages til prøve for vækst og histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (i henhold til dette eksempel). Denne procedure fortsættes indtil det 20. individ enten flyttes over til de resterende post-NF stadium 62 individer eller udtages til prøve. Den randomiserede procedure, der anvendes, bør give alle organismer i testen den samme sandsynlighed for at blive udvalgt. Dette kan nås ved at anvende enhver randomiserende metode, men det kræver også, at hver enkelt haletudse fanges i net på et eller andet tidspunkt i NF stadium 62-delprøvetagningsperioden.

Figur 1

Hypotetisk eksempel på en NF stadium 62-prøvetagningsplan for en enkelt replikatbeholder



42. De endepunkter, der opnås ved larvedelprøvetagningen er: (1) tid til NF stadium 62 (dvs. antal dage mellem befrugtning og NF stadium 62), (2) eksterne abnormiteter, (3) morfometri (*f.eks.* vægt og længde) og (4) histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen.

Human aflivning af haletudser

43. Delprøven af haletudser i NF stadium 62 (5 individer pr. replikat) aflives ved at nedsænke dem i 30 min. i en passende mængde (*f.eks.* 500 ml) anæstesiopløsning (*f.eks.* 0,3 % opløsning af MS-222, tricainmethansulfonat, CAS.886-86-2). MS-222 bør være bufret med natriumbicarbonat, til en pH-værdi på omkring 7,0, fordi en ubufret MS-222-opløsning er sur og irriterer frøhud, hvilket resulterer i en dårlig absorption og unødvendig ekstra stress for organismerne.

44. Ved hjælp af en lille ketsjer fjernes en haletudse fra forsøgskammeret og transporteres til (anbringes i) anæstesiopløsningen. Dyret er aflivet korrekt og parat til obduktion, når det ikke længere reagerer på eksterne stimuli som f.eks. knibning i bagbenet med en pincet.

Morfometri (vægt- og længdetilvækst)

45. Måling af vådvægt (nærmeste mg) og længde fra snude til kloakåbning (SVL) (nærmeste 0,1 mm) for hver enkelt haletudse bør foretages straks efter, at den ikke længere reagerer efter anæstesi (figur 2a). Billedanalysesoftware kan anvendes til at måle SVL ud fra et billede. Haletudserne duppes tørre før vejning for at fjerne overskydende vand. Efter

▼M8

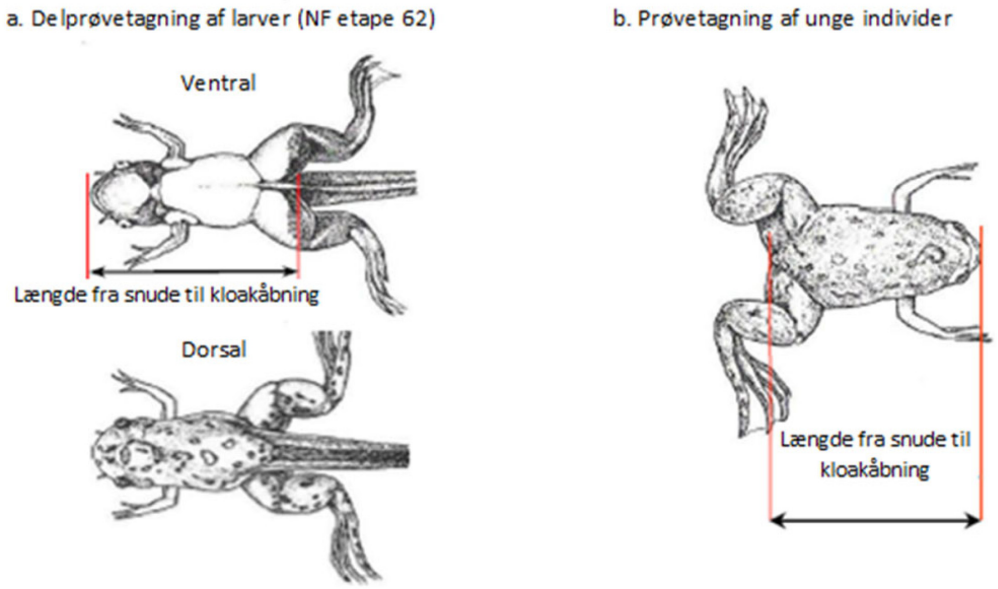
målinger af størrelse (vægt og SVL) registreres eller noteres eventuelle alvorlige morfologiske abnormiteter og/eller kliniske tegn på toksicitet såsom scoliose (se tillæg 8), pettekie og blødning, og det anbefales, at der foretages digital dokumentation. Pettekie er små røde eller lilla blødninger i hudkapillærerne.

Indsamling af væv og fiksering

46. I larvedelprøven foretages en histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Den nedre del af torsoen bag forlemmerne fjernes og kasseres. Det trimmede kadaver fikseres i Davidson's fikseringsmiddel. Mængden af fikseringsmiddel i beholderen bør være mindst ti gange det anslåede volumen af vævene. Fikseringsvæsken bør omrystes eller cirkuleres ordentligt for at sikre en korrekt fiksering af det pågældende væv. Alle væv ligger i Davidson's fikseringsmiddel i mindst 48 timer, men ikke længere end 96 timer, hvorefter de skylles i demineraliseret vand og opbevares i 10 % neutral bufret formalin (1) (29).

Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen

47. For hver enkelt larvedelprøve (fikseret væv) foretages en histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen, dvs. diagnostisering og inddeling efter alvorsgrad (29) (30).



Figur 2: Kendetegn for måling af længde fra snude til kloakåbning i LAGDA i NF stadium 62 (a) og unge frøer (b). De definerende kendetegn ved NF stadium 62 (a): Hovedet har samme bredde som kroppen, lugtenerven er kortere end diameteren af bulbus olfactorius (set fra ryggen), og forlemmerne befinder sig på niveau med hjertet (set fra bugen). Billeder tilpasset fra Nieuwkoop og Faber (1994).

Afslutning af larveeksponeringen

48. På grund af det oprindelige antal haletudser forventes det, at der sandsynligvis vil være en lille procentdel af individerne, der ikke udvikler sig normalt, og som ikke fuldfører metamorfosen (NF stadium 66) inden for

▼M8

en rimelig tid. Larveandelen af eksponeringen bør ikke overstige 70 dage. Haletudser, der måtte være tilbage ved udløbet af denne periode, aflives (jf. punkt 43), deres vådvægt og SVL måles, de inddeles i henhold til Nieuwkoop og Faber, 1994, og eventuelle udviklingsmæssige abnormiteter noteres.

Udvælgelse efter NF stadium 66

49. Ti individer pr. beholder bør fortsætte fra NF stadium 66 (fuldstændig haleresorption), indtil eksponeringen afsluttes. Derfor bør der, når dyrene har nået NF stadium 66 eller efter 70 dage (hvad der måtte komme først), foretages en udvælgelse. De dyr i post NF stadium 66, der ikke skal fortsætte eksponeringen, udvælges vilkårligt.

50. De dyr, der ikke udvælges til fortsat eksponering, aflives (jf. punkt 43). Der foretages målinger af udviklingsstadiet, vådvægt og SVL (figur 2b) på hvert enkelt dyr, ligesom der foretages en makroskopisk undersøgelse. Fænotypisk køn (baseret på kønskirtelmorfologi) noteres som hun, han eller ubestemmelig.

Prøveudtagning af unge individer

Oversigt over prøveudtagning af unge individer

51. De resterende dyr eksponeres fortsat frem til 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i fortyndingsvandkontrollen (og/eller opløsningsmiddelkontrollen, hvis det er relevant). Ved eksponeringsperiodens udløb aflives de resterende dyr (maksimum 10 frøer pr. replikat), og de forskellige endepunkter måles eller evalueres og registreres: (1) morfometri (vægt og længde), (2) kønsfordelingen mellem fænotype/genotype, (3) levervægt (lever-somatisk indeks), (4) histopatologi (kønskirtler, ægge- og sædledere, lever og nyrer) og eventuelt (5) plasma VTG.

Human aflivning af frøer

52. De unge individer, der befinder sig på stadiet efter afslutning af metamorfosen, aflives med en intraperitoneal injektion af bedøvelsesmiddel, *f.eks.* 10 % MS-222 i en passende phosphatbufret opløsning. Frøerne kan udtages til prøve, når de ikke længere reagerer (normalt omkring 2 minutter efter injektion, hvis der anvendes 10 % MS-222 i en dosis på 0,01 ml pr. g frø). Selv om de unge frøer kunne nedsænkes i en højere koncentration af bedøvelsesmiddel (MS-222), har erfaringen vist, at det varer længere, inden de bliver bedøvet med denne metode, og varigheden muliggør måske ikke prøveudtagning. Injektion medfører en effektiv og hurtig aflivning forud for prøveudtagning. Prøveudtagningen bør ikke indledes, før det er blevet fastslået, at frøerne ikke længere reagerer, for at sikre, at dyrene er døde. Hvis frøerne viser tegn på, at de lider meget (virkelig meget, og det med pålidelighed kan forudsiges, at de vil dø), og betragtes som døende, skal de bedøves og aflives og behandles som dødelighed i forbindelse med dataanalysen. Når en frø aflives på grund af dødelighed, skal det noteres og rapporteres. Afhængigt af, hvornår frøen aflives i løbet af undersøgelsen, kan den opbevares med henblik på histopatologiske analyser (fiksering af frøen med henblik på eventuel histopatologi).

Morfometri (vægt- og længdetilvækst)

53. Målingerne af vådvægt og SVL (figur 2b) svarer til de målinger, der er opstillet for larvedelprøver.

▼M8

Plasma VTG (valgfrit)

54. VTG er en bredt anerkendt biomarkør, der er et resultat af eksponering for østrogene kemikalier. I LAGDA kan plasma VTG eventuelt måles i unge individer (dette kan navnlig være relevant, hvis kemikaliet mistænkes for at være et østrogen).

55. Bagbenene skæres af de aflivede unge individer, og blod opsamles ved hjælp af et hepariniseret kapillærrør (selv om alternative metoder til indsamling af blod som f.eks. hjertepunktur kan være egnede). Blodet overføres til et mikrocentrifugeringsrør (*f.eks.* et volumen på 1,5 ml) og centrifugeres for at opnå plasma. Plasmaprøverne opbevares ved -70 °C eller derunder, indtil bestemmelsen af VTG foretages. Koncentrationen af plasma VTG kan måles ved hjælp af enzymkoblet immunadsorptionsteknik (ELISA) (tillæg 6), eller ved hjælp af en alternativ metode som f.eks. massespektrometri (31). Artsspecifikke antistoffer foretrækkes på grund af større følsomhed.

Genetisk kønsbestemmelse

56. Hver enkelt ung frøs genetiske køn bestemmes på grundlag af de markører, der er udviklet af Yoshimoto *et al.* (11). Med henblik på bestemmelse af det genetiske køn indsamles en del af (eller hele) bagbenet (eller andet væv), der blev fjernet under dissekeringen og lagres i et mikrocentrifugeringsrør (vævsprøver fra frøer kan tages af alt væv). Væv kan lagres ved -20 °C eller derunder, indtil deoxyribonukleinsyre (DNA) isoleres. Isolering af DNA fra væv kan foretages med kommercielt tilgængelige kits, og analysen af tilstedeværelse eller fravær af markøren foretages ved hjælp af polymerasekædereaktionsmetoden (tillæg 5). Generelt er overensstemmelsen mellem histologisk bestemt køn og genotype i kontroldyrene ved prøvetagningstidspunktet for unge individer i kontrolgrupperne over 95 %.

Indsamling af væv og fiksering til histopatologi

57. Kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og levere indsamles til histologisk analyse under den endelige prøvetagning. Bughulen åbnes, og leveren udtages og vejes. Dernæst fjernes fordøjelsesorganerne (*f.eks.* mave, tarme) omhyggeligt fra den lavere del af bughulen for at blotlægge kønskirtlerne, nyrerne og ægge- og sædlederne. Synlige morfologiske abnormiteter i kønskirtlerne registreres. Endelig fjernes bagbenene, hvis de ikke allerede er blevet fjernet med henblik på opsamling af blod. De indsamlede levere og kadavere med kønskirtlerne *in situ* anbringes straks i Davidson's fikseringsmiddel. Mængden af fikseringsmiddel i beholderen bør være mindst ti gange det anslåede volumen af vævene. Alle væv ligger i Davidson's fikseringsmiddel i mindst 48 timer, men ikke længere end 96 timer, hvorefter de skylles i demineraliseret vand og opbevares i 10 % neutral bufret formalin (1) (29).

Histopatologi

58. Hver prøve af en ung frø evalueres histologisk for sygdom i kønskirtlerne, ægge- og sædlederne, nyre- og levervæv, dvs. diagnosticering og inddeling efter alvorsgrad (32). Kønskirtelfænotypen udledes også af denne evaluering (*f.eks.* ovarier, testis, interkøn), og sammen med de individuelle målinger af genetisk køn kan disse observationer anvendes til at beregne fænotype/genotype-kønsfordelingen.

▼M8

DATA OG RAPPORTERING

Statistisk analyse

59. LAGDA genererer tre former for data, der kan analyseres statistisk: (1) kvantitative kontinuerlige data (vægt, SVL, LSI, VTG), (2) tid til hændelse-data for udviklingsraterne (dvs. dage til NF stadium 62 fra påbegyndelsen af assayet) og (3) ordinaldata i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier fra histopatologiske evalueringer.

60. Det anbefales, at testdesignet og valget af statistisk test har tilstrækkelig styrke til at påvise ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC- eller ECx-værdi. Statistiske analyser af data (generelt på grundlag af replikatgennemsnit) bør helst følge de procedurer, der er beskrevet i dokumentet Current Approaches i Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (33). Tillæg 7 til denne forsøgsmetode indeholder det anbefalede beslutningstræ for statistisk analyse og vejledning i behandling af data og i valg af den mest velegnede statistiske test eller model, der skal anvendes i LAGDA.

61. Dataene fra prøveudtagning af unge frøer (*f.eks.* vækst, LSI) bør analyseres separat for genotypisk køn, da det genotypiske køn bestemmes for alle frøer.

Dataanalyseovervejelser

Brug af kompromitterede replikater og behandlinger

62. Replikater og behandlinger kan kompromitteres på grund af for høj dødelighed som følge af åbenlys toksicitet, sygdom eller tekniske fejl. Hvis en behandling kompromitteres på grund af sygdom eller tekniske fejl, bør der være tre ukompromitterede behandlinger med tre ukompromitterede replikater, som kan analyseres. Hvis åbenlys toksicitet forekommer ved høje behandlinger, foretrækkes det, at mindst tre behandlingsniveauer med tre ukompromitterede replikater kan analyseres (stemmer overens med Maximum Tolerated Concentration tilgangen i OECD-testvejledninger (34)). Ud over dødelighed kan tegn på åbenlys toksicitet omfatte adfærdsmæssige virkninger (f.eks. at dyrene flyder på overfladen, ligger på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet), morfologiske skader (f.eks. hæmoragiske skader, ødemer på maven) eller unormalt fødeindtag, når der foretages en kvalitativ sammenligning med kontroldyrene.

Opløsningsmiddelkontrol

63. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger (hvis et sådant anvendes). Dette sker ved en statistisk sammenligning af gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand. De mest relevante endepunkter, der skal tages i betragtning i forbindelse med denne analyse, er vækstdeterminanterne (vægt og længde), da disse kan påvirkes af generel toksicitet. Hvis der påvises statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand og gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, bør den bedste faglige vurdering anvendes til at bestemme, om gyldigheden af testen er kompromitteret. Hvis de to kontroller afviger fra hinanden, bør de behandlinger, der er eksponeret for kemikaliet, sammenlignes med gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, medmindre det er velkendt, at sammenligning med gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand foretrækkes. Hvis der ikke findes nogen statistisk signifikant forskel mellem de to kontrolgrupper, anbefales det, at de behandlinger, der er eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med de samlede grupper (opløsningsmiddel- og fortyndingsvandkontrolgrupper), medmindre det er velkendt, at sammenligning med fortyndingsvandkontrolgruppen eller opløsningsmiddelkontrolgruppen foretrækkes.

▼M8

Testrapport

64. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

— Fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— Stof med kun én bestanddel:

fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

— Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter:

— Videnskabeligt navn, stamme, hvis oplysninger herom foreligger, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og den efterfølgende håndtering af dem.

— Forekomsten af scoliose i historiske kontroller for den anvendte stamkultur.

Testbetingelser:

— Lysperiode(r)

— Testdesign (f.eks. testkamrenes størrelse, materiale og vandmængde, antal testkamre og replikater, antal testorganismer pr. replikat)

— Fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)

— Metode til dosering af testkemikaliet (*f.eks.* pumper, fortyndingssystemer)

— Metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, grænsen for kvantitativ bestemmelse, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i en egentlig opløsning

— Fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restchlorniveau (hvis målt), iodid i alt, total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og alle andre målinger, der er foretaget

— de nominelle testkoncentrationer, de målte middelværdier og deres standardafvigelser

— vandkvalitet i testbeholderne, pH, temperatur (dagligt) og koncentration af opløst ilt

▼**M8**

— Detaljerede oplysninger om fodring (*f.eks.* fodertype, -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultater:

— Dokumentation for, at kontrollerne opfyldte validitetskriterierne

— Data for kontrol- (og opløsningsmiddelkontrol, når der anvendes opløsningsmiddel) og behandlingsgrupper som følger: dødelighed og observeret abnormitet, tid til NF stadium 62, histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (kun larveprøven), vækst (vægt og længde), LSI (kun prøven af helt unge frøer), genetisk/fænotypisk kønsfordeling (kun prøven af unge frøer), histopatologiske undersøgelsesresultater for kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever (kun prøven af unge frøer) og plasma VTG (kun prøven af unge frøer, valgfri)

— Statistisk analysemetode og behandling af data (anvendt statistisk test eller model)

— koncentration uden observeret effekt (NOEC) ved hver måling

— Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) ved hver måling (ved $\alpha = 0{,}05$). ECx for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentration/respons-kurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse.

— Eventuelle afvigelser fra forsøgsmetoden og afvigelser fra acceptkriterierne samt overvejelser vedrørende de potentielle konsekvenser for resultaterne af testen.

65. I forbindelse med resultaterne af endepunktsmålingerne bør gennemsnitsværdierne og deres standardafvigelser (om muligt for såvel replikat som koncentration) præsenteres.

66. Mediantid til NF stadium 62 i kontrolgrupperne bør beregnes og præsenteres som gennemsnittet af replikatmedianerne og deres standardafvigelse. For behandlinger beregnes ligeledes en medianbehandling, der præsenteres som gennemsnittet af replikatmedianerne og deres standardafvigelse.

LITTERATUR

(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 og Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W og Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1 565.

(7) Villalpando I og 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 og Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K og Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1 411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K og 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 og 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: 2 469-2 474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S og 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 og 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 og 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 og 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) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(18) Kapitel C.29 i dette bilag Let bionedbrydelighed - CO2 i lukkede beholdere (Headspace-test).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL og Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD draft (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 og 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., s. 84 ff.

(25) Kapitel C.38 i dette bilag, Amphibian Metamorphosis Assay (Assay for amfibiemetamorfose).

(26) Kapitel C.48 i dette bilag, Assay for fisks reproduktion på kort sigt.

(27) Kapitel C.41 i dette bilag, Test af fisks kønsudvikling.

(28) Kapitel C.49 i dette bilag, Test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET).

(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 og Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG og Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

Tillæg 1

DEFINITIONER

Apikalt endepunkt: forårsager en virkning på populationsniveau.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymkoblet immunadsorptionsassay).

ECx: (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. F.eks. er EC50 en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Dpf: dage efter befrugtning.

Gennemstrømningstest: en test med en stadig strøm af testopløsninger gennem testsystemet under hele eksponeringen.

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC): den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, der er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt. Der findes en vejledning i tillæg 7.

Middel letal koncentration (LC50): den koncentration af testkemikaliet, som skønnes at være dødelig for 50 % af testorganismerne i løbet af testens varighed.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC): den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringstid

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

VTG: vitellogenin er en phospholipid-glycoprotein-prækursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

▼**M8**

Tillæg 2

NOGLE KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Stof	Koncentrationsgrænse
Partikler	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

▼**M8**

Tillæg 3

TESTBETINGELSER FOR LAGDA

1. Testarter	*Xenopus laevis*
2. Testtype	Gennemstrømningstest
3. Vandtemperatur	Den nominelle temperatur er 21 °C. Middeltemperaturen under hele testforløbet er ± 1 °C (forskellene mellem replikater og mellem behandlinger bør ikke overstige 1,0 °C).
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede) 600-2 000 lux (lumen/m^2) ved vandoverfladen
5. Lysperiode	12 t. lys, 12 t. mørke
6. Volumen af testopløsning og testbeholder (tank)	4-10 l (minimum 10-15 cm vanddybde) Beholder af glas eller rustfrit stål
7. Volumenudskiftning af testopløsninger	Konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering (*f.eks.* 5 volumenudskiftninger om dagen)
8. Testorganismernes alder ved start	Nieuwkoop og Faber (NF) stadium 8-10
9. Antal organismer pr. replikat	20 dyr (embryoner)/beholder (replikat) ved eksponeringens start, og 10 dyr (unge individer)/beholder efter NF stadium 66 til afslutningen af eksponeringen
10. Antal behandlinger	Minimum 4 testkemikaliebehandlinger plus passende kontrol(ler)
11. Antal replikater pr. behandling	4 replikater pr. behandling for testkemikaliet og 8 replikater for kontrol(ler)
12. Antal organismer pr. testkoncentration	Minimum 80 dyr pr. behandling for testkemikaliet og minimum 160 dyr for kontrol(ler)
13. Fortyndingsvand	Alt vand, der tillader en normal vækst og udvikling af *X. laevis* (*f.eks.* kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand)
14. Beluftning	Ikke påkrævet, men beluftning af beholderne kan være nødvendig, hvis niveauerne af opløst ilt falder under de anbefalede grænser, og stigningerne i flowet af testopløsning når op på maksimumsgrænsen.
15. Opløst ilt i testopløsningen	Opløst ilt: ≥ 40 % af luftmætningsværdien eller ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH i testopløsningen	6,5-8,5 (forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige 0,5)
17.	Testopløsningens hårdhed og alkalinitet	10-250 mg $CaCO_3$/l
18.	Fodring	(Se tillæg 4)
19.	Eksponeringsperiode	Fra NF stadium 8-10 til ti uger efter middeltiden til NF stadium 62 i vand- og/eller opløsningsmiddelkontrolgruppen (maksimum 17 uger)
20.	Biologiske endepunkter	Dødelighed (og observeret abnormitet), tid til NF stadium 62 (larveprøve), histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (larveprøve), vækst (vægt og længde), lever-somatisk indeks (prøve af unge frøer), genetisk/fænotypisk kønsfordeling (prøve af unge frøer), histopatologisk undersøgelse af kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever (prøve af unge frøer) og plasma vitellogenin (prøve af unge frøer, valgfri)
21.	Valideringskriterier for testen	Opløst ilt bør være > 40 % af luftmætningsværdien; middelvandtemperaturen bør være 21 ± 1 °C, og forskellene mellem replikater og mellem behandlinger bør være < 1,0 °C; testopløsningens pH-værdi bør ligge på mellem 6,5 og 8,5; dødeligheden i kontrolgruppen bør være ≤ 20 % i hver replikat, og middeltiden til NF stadium 62 bør være ≤ 45 dage; testorganismernes gennemsnitsvægt ved NF stadium 62 og ved afslutningen af assayet i kontrollerne og i opløsningsmiddelkontrollerne (hvis relevant) skal nå op på henholdsvis 1,0 ± 0,2 og 11,5 ± 3 g; der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

▼**M8**

Tillæg 4

FODRING

Det bemærkes, at selv om denne fodring anbefales, er alternativer tilladt, forudsat at testorganismerne vokser og udvikler sig tilfredsstillende.

Larvefodring

Fremstilling af larvefoder

A. 1:1 (v/v) ørredstartfoder: alge/TetraFin® (eller tilsvarende)

1. Ørredstartfoder: Blend 50 g ørredstartfoder (fint granulat eller pulver) og 300 ml egnet filtreret vand ved højeste blenderhastighed i 20 sekunder.

2. Alge/TetraFin® (eller tilsvarende) blanding: Blend 12 g spirulina-algevafler og 500 ml filtreret vand ved høj hastighed i 40 sekunder, blend 12 g Tetrafin® (eller tilsvarende) med 500 ml filtreret vand, og bland derefter de to dele til 1 l 12 g/l spirulinaalger og 12 g/l Tetrafin®(eller tilsvarende).

3. Bland lige dele blendet ørredstartfoder og alge/TetraFin®(eller tilsvarende) blanding.

B. Saltsøkrebs:

15 ml saltsøkrebseæg klækkes i 1 l saltvand (fremstillet ved at tilsætte 20 ml NaCl til 1 l demineraliseret vand). Efter beluftning i 24 timer ved rumtemperatur under konstant lys høstes saltsøkrebsene. Saltsøkrebsene får lov til at bundfælde i 30 min. ved, at beluftningen stoppes. Blærer, der flyder op i toppen af beholderen, hældes fra og kasseres, og saltsøkrebsene hældes igennem et passende filter og fortyndes op til 30 ml med filtreret vand.

Fodringsprotokol

Tabel 1 indeholder en oversigt over den type og mænge foder, der anvendes på larvestadiet af eksponeringen. Dyrene fodres tre gange om dagen mandag til fredag og en gang om dagen i weekender.

Tabel 1

Fodring af *X. laevis* larver i gennemstrømningstest

Tid (*) (efter befrugtning)	Ørredstartfoder: alger/TetraFin® (eller tilsvarende)		Saltsøkrebs	
	Hverdag (tre gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)	Hverdag (to gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)
Dag 4-14 (i uge 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (fra dag 8 til 15) 1 ml (fra dag 16)	0,5 ml (fra dag 8 til 15) 1 ml (fra dag 16)
Uge 2	0,67 ml	2,4 ml		
Uge 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Uge 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Uge 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Tid (*) (efter befrugtning)	Ørredstartfoder: alger/TetraFin® (eller tilsvarende)		Saltsøkrebs	
	Hverdag (tre gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)	Hverdag (to gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)
Uge 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Uge 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Uge 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Dag 0 defineres som den dag, hvor injektionen med hCG foretages.

Foderomlægning fra larve til ung frø

Efterhånden som larverne fuldfører metamorfosen, går de over til den nedenfor beskrevne fodersammensætning for unge frøer. Under denne overgang bør der skæres ned på larvefoderet, mens foderet til unge frøer øges. Det kan ske ved at reducere larvefoderet proportionalt, mens foderet til unge frøer øges proportionalt, efterhånden som hver gruppe på fem haletudser passerer NF stadium 62 og nærmer sig afslutningen af metamorfosen ved NF stadium 66.

Fodring af unge individer

Foder til unge frøer

Når metamorfosen er fuldført (stadium 66), ændres foderplanen til 3/32 inch synkende foder til frøer af høj kvalitet alene (Xenopus Express™, FL, USA) eller tilsvarende.

Fremstilling af knuste piller til overgangen fra larver til unge frøer

Pillerne males kortvarigt i en kaffekværn eller blender eller knuses i en morter for at gøre dem ca. en tredjedel mindre. En for langvarig forarbejdning resulterer i pulver, som kasseres.

Fodringsprotokol

Tabel 2 indeholder en oversigt over den type og mængde foder, der anvendes til unge frøer og frøer på voksenstadiet. Dyrene bør fodres en gang dagligt. Det bemærkes, at efterhånden som dyrene gennemgår metamorfosen, fodres de fortsat med saltsøkrebs, indtil > 95 % af dyrene har fuldført metamorfosen.

Dyrene fodres ikke på den dag, hvor testen afsluttes, så foder ikke påvirker vægtmålingerne.

Tabel 2

Fodring af unge *X. laevis*-frøer i gennemstrømningstest. Det bemærkes, at dyr, der ikke har gennemgået metamorfosen, herunder de dyr, hvis metamorfose er blevet forsinket af den kemiske behandling, ikke kan spise piller, der ikke er knust.

Tid (*) (Uger efter mediandatoen for metamorfose)	Knuste piller (mg pr. ung frø)	Hele piller (mg pr. ung frø)
Efterhånden som dyrene fuldfører metamorfosen	25	0
Uge 0-1	25	28

▼**M8**

Tid (*) (Uger efter mediandatoen for metamorfose)	Knuste piller (mg pr. ung frø)	Hele piller (mg pr. ung frø)
Uge 2-3	0	110
Uge 4-5	0	165
Uge 6-9	0	220

(*) Den første dag i uge 0 er medianmetamorfosedatoen hos kontroldyrene.

▼M8

Tillæg 5

GENETISK KØNSBESTEMMELSE

Metoden til genetisk kønsbestemmelse for *Xenopus laevis* er baseret på Yoshimoto *et al.*, 2008. De detaljerede procedurer for genotypebestemmelse kan om nødvendigt findes i denne publikation. Alternative metoder (f.eks. high-throughput qPCR) kan anvendes, hvis det skønnes hensigtsmæssigt.

X. laevis-primere

DM-W-markør

Fremadrettet: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Bagudrettet: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiv kontrol

Fremadrettet: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Bagudrettet: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Oprensning af DNA

Oprens DNA fra muskel- eller hudvæv ved hjælp af f.eks. Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kategori nr. 69 506) eller tilsvarende i henhold til instruktionerne i kittet. DNA kan elueres fra kolonner til oprensning, idet der anvendes mindre buffer for at opnå mere koncentrerede prøver, hvis det skønnes nødvendigt med henblik på PCR. Da DNA er ret stabilt, er det vigtigt at undgå krydskontaminering, der vil kunne føre til forkert karakterisering af hanner som hunner eller omvendt.

PCR

En prøveprotokol, der anvender JumpStart™ *Taq* fra Sigma, er skitseret i **tabel 1**.

Tabel 1

Prøveprotokol, der anvender JumpStart™ *Taq* fra Sigma

Mastermix	1x (µl)	[Endelig]
NFW (*)	11	—
10X buffer	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10 mM hver)	0,4	200 µm
Markør for primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Markør for bagudrettet primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Kontrol af primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Kontrol af primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 enheder/µl
DNA-skabelon	1,0	~200 pg/µl

(*) Nukleasefrit vand
Bemærk: Ved fremstillingen af mastermix fremstilles der ekstra for at tage hensyn til et eventuelt tab i forbindelse med pipettering (eksempel: 25x bør anvendes til blot 24 reaktioner).

▼**M8**

Reaktion:

Mastermix	19,0 µl
Skabelon	1,0 µl
I alt	20,0 µl

Thermocyclerprofil:

Trin 1.	94 °C	1 min.
Trin 2.	94 °C	30 sek.
Trin 3:	60 °C	30 sek.
Trin 4.	72 °C	1 min.
Trin 5.	Gå til trin 2.	35 cyklusser
Trin 6.	72 °C	1 min.
Trin 7.	4 °C	stop

PCR-produkter kan straks køres igennem en gel, eller de kan lagres ved 4 °C.

Agarosegelelektroforese (3 %)(prøveprotokol)

50X TAE

Tris	24,2 g
Iseddikesyre	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Tilsæt vand op til 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agarose

3 dele NuSieve™ GTG™ agarose

1 del Fisher agarose lav elektro-osmose (EEO)

Metode

1. Fremstil en 3 % gel ved at tilsætte 1,2 g agaroseblanding til 43 ml 1X TAE. Omryst forsigtigt for at opløse større klumper.

2. Agaroseblandingen kommes i mikrobølgeovn, indtil den er helt opløst (undgå, at den koger over). Afkøles lidt.

3. Tilsæt 1,0 µl etidiumbromid (10 mg/ml). Omryst forsigtigt kolben. Bemærk, at ethidiumbromid er et mutagen, så alternative kemikalier bør, så vidt det er teknisk muligt, anvendes på dette trin for at minimere sundhedsfaren for arbejdstagerne ([1]).

4. Hæld gel i formen med blad. Afkøl fuldstændigt.

([1]) I henhold til artikel 4, stk. 1, i Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2004/37/EF af 29. april 2004 om beskyttelse af arbejdstagerne mod risici for under arbejdet at være udsat for kræftfremkaldende stoffer eller mutagener (sjette særdirektiv i henhold til artikel 16, stk. 1, i Rådets direktiv 89/391/EØF) (EUT L 158, 30.4.2004, s. 50).

▼**M8**

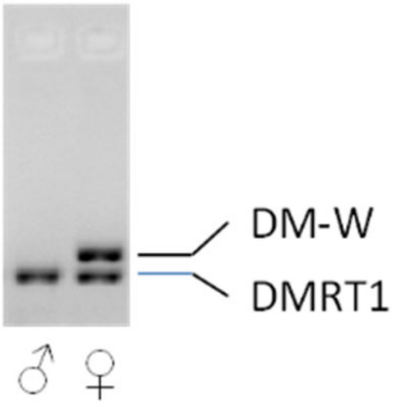
5. Tilsæt gel til apparaturet. Dæk gelen med 1X TAE.

6. Tilsæt 1 µl 6x loading dye til hvert 10 µl PCR-produkt.

7. Pipettér prøver i brøndene.

8. Kør ved 160 konstant spænding i ~20 minutter.

   Et agarosegelbillede, som viser de båndmønstre, der er indikerer han- og hunindivider, er vist i **figur 1**.



Figur 1: Agarosegelbillede, som viser det båndmønster, der indikerer et hanindivid (♂) (enkelt bånd ~203 bp: DMRT1) og et hunindivid (♀) (to bånd ved ~259 bp: DM-W og 203 bp:DMRT1).

LITTERATUR

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: 2 469-2 474.

▼M8

Tillæg 6

MÅLING AF VITELLOGENIN

Målingen af vitellogenin (VTG) foretages ved hjælp af en enzymkoblet immunadsorptionsteknik (ELISA), der oprindeligt blev udviklet til tykhovedet elritse VTG (Parks *et al.*, 1999). Der findes i øjeblikket ingen kommercielt tilgængelige antistoffer for *X. laevis*. På grund af den righoldige information om dette protein og tilgængeligheden af omkostningseffektive kommercielle antistofproduktionstjenester, er det dog rimeligt at antage, at laboratorierne let kan udvikle et ELISA med henblik på denne måling (Olmstead *et al.*, 2009). Også Olmstead *et al.* (2009) har en beskrivelse af assayet som ændret for VTG i *X. tropicalis*, som vist nedenfor. Metoden anvender et antistof mod *X. tropicalis* VTG, men det er velkendt, at den også fungerer for *X. laevis* VTG. Det bemærkes, at ikke-konkurrerende ELISA'er også kan anvendes, og at disse kan have lavere detektionsgrænser end den nedenfor beskrevne metode.

Materialer og reagenser

— præadsorberet 1. antistof (Ab) serum

— Bland 1 del anti-*X. tropicalis* VTG 1. Ab serum med 2 dele kontrolhanplasma ved rumtemperatur i ~ 75 minutter, sæt på is i 30 min., centrifuger > 20K x G i 1 time ved 4 °C, fjern supernatant, delprøve, opbevar ved -20 °C.

— 2. antistof

— Ged anti-kanin IgG-HRP-konjugat (f.eks. Bio-Rad 172-1019)

— VTG-standard

— oprenset *X. laevis* VTG ved 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidin) (f.eks. KPL 50-76-00; eller Sigma T0440)

— normalt gedeserum (NGS)f.eks. Chemicon® S26-100 ml)

— 96-brønds EIA polystyrenmikrotiterplader (f.eks. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— 37 °C hybridiseringsovn (eller hurtig ækvilibrering i inkubator) til plader, vandbad til rør

— andet almindeligt laboratorieudstyr, kemikalier og forsyninger.

Opskrifter

Coatingbuffer (50 mM karbonatbuffer, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
vand	428 ml

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

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
vand	810 ml

▼**M8**

Vaskebuffer (PBST):

10X PBS	100 ml
vand	900 ml

Juster pH til 7,3 med 1 M HCl, og tilsæt derefter 0,5 ml Tween-20.

Assaybuffer:

normalt gedeserum (NGS)	3,75 ml
Vaskebuffer	146,25 ml

Prøvetagning

Blod opsamles med et heparinieret mikrohæmatokritrør og lægges på is. Efter centrifugering i 3 min. ridses røret, brækkes åbent, og plasmaet overføres til 0,6 ml mikrocentrifugeringsrør, der indeholder 0,13 enheder lyofiliseret aprotinin. (Disse rør klargøres på forhånd ved at tilsætte en passende mængde aprotinin, nedfryse og lyofilisere i en speed-vac ved lav varme, indtil det er tørt). Plasma opbevares ved -80 °C, indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde for en plade

Overfladebehandling af pladen

Bland 20 µl oprenset VTG med 22 ml karbonatbuffer (slutopløsning 3 µg/ml). Tilsæt 200 µl til hver brønd i en 96-brønds plade. Dæk pladen med klæbende overtræksfilm, og lad den inkubere ved 37 °C i 2 timer (eller ved 4 °C natten over).

Blokering af pladen

Blokeringsopløsningen fremstilles ved at tilsætte 2 ml normalt gedeserum (NGS) til 38 ml karbonatbuffer. Fjern overfladebehandlingsopløsningen, og ryst pladen tør. Tilsæt 350 µl af blokeringsopløsningen til hver brønd. Dæk med klæbende overtræksfilm, og inkuber ved 37 °C i 2 timer (eller ved 4 °C natten over).

Fremstilling af standarder

5,8 µl oprenset VTG-standard blandes med 1,5 ml assaybuffer i et 12 x 75 mm borosilikatreagensglas til engangsbrug. Dette giver 12 760 ng/ml. Dernæst laves der en seriel fortynding ved at tilsætte 750 µl af den forrige fortynding til 750 µl assaybuffer for at nå frem til slutfortyndinger på 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 og 50 ng/ml.

Klargøring af prøver

Begynd med en 1:300- (f.eks. bland 1 µl plasma med 299 µl assaybuffer) eller 1:30-fortynding af plasma i assaybuffer. Hvis der forventes en stor mængde VTG, kan yderligere eller større fortyndinger være nødvendige. Forsøg at holde B/B_o inden for standardintervallet. Er der tale om prøver uden større mængder VTG, f.eks. kontrolhanner og -hunner (som alle er umodne), anvendes 1:30-fortyndingen. Prøver, der er fortyndet mindre end dette, kan udvise uønskede matrixeffekter.

Derudover anbefales det, at der køres en positiv kontrol på hver plade. Denne stammer fra en plasmapulje indeholdende yderst inducerede VTG-niveauer. Puljen er indledningsvis fortyndet i NGS, delt i delprøver og lagret ved -80 °C. En delprøve pr. plade optøs og fortyndes yderligere i assaybuffer og køres på samme måde som testprøven.

▼**M8**

Inkubation med 1. antistof

Det 1. antistof fremstilles ved at lave en 1:2000-fortynding af præadsorberet 1. antistofserum i assaybuffer (f.eks. 8 µl til 16 ml assaybuffer). Bland 300 µl opløsning af 1. antistof med 300 µl prøve/standard i et glasrør. B_o-røret klargøres på samme måde med 300 µl assaybuffer og 300 µl antistof. NSB-røret bør ligeledes klargøres med blot 600 µl assaybuffer, dvs. ingen antistof. Dæk rørene med Parafilm, og omryst forsigtigt. Inkuberes i vandbad ved 37 °C i 1 time.

Vask af pladen

Lige før inkubationen af 1. antistof er færdig, vaskes pladen. Dette sker ved at ryste indholdet ud og duppe den tør på absorberende papir. Fyld derefter brøndene med 350 µl vaskeopløsning, hæld ud, og dup tør. En multikanal gentagelsespipette eller pladevasker er nyttig her. Vasketrinnet gentages to gange, så pladen vaskes i alt tre gange.

Påfyldning af pladen

Når pladen er blevet vasket, fjernes rørene fra vandbadet og omrystes let. Tilsæt 200 µl fra hver prøve, standard, B_o og NSB-rør til to brønde på pladen. Dæk pladen med klæbende overtræksfilm, og lad den inkubere i 1 time ved 37 °C.

Inkubation med 2. antistof

Ved afslutningen af inkubationen på det foregående trin vaskes pladen igen som beskrevet ovenfor. Det fortyndede 2. antistof fremstilles ved at blande 2,5 µl af 2. antistof med 50 ml assaybuffer. Tilsæt 200 µl fortyndet 2. antistof til hver brønd, forsegl som beskrevet ovenfor, og inkuber pladen i 1 time ved 37 °C.

Tilsætning af substrat

Når inkubationen med det 2. antistof er afsluttet, vaskes pladen tre gange som beskrevet ovenfor. Tilsæt derefter 100 µl TMB substrat til hver brønd. Lad det reagere i 10 minutter, helst ikke i kraftigt lys. Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl 1 M phosphorsyre. Dette vil ændre farven fra blå til kraftig gul. Mål absorbansen ved 450 nm ved hjælp af en pladelæser.

Beregning af B/Bo

Træk den gennemsnitlige NSB-værdi fra alle målingerne. B/B_o for hver prøve og standard beregnes ved at dividere absorbansværdien (B) med B_o-prøvens gennemsnitlige absorbans.

Standardkurve og bestemmelse af de ukendte mængder

Generer en standardkurve ved hjælp af grafiksoftware (f.eks. Slidewrite™ eller Sigma Plot®), der ekstrapolerer mængden fra B/B_o i prøven på grundlag af B/B_o standarder. Typisk er mængden plottet ind på en logaritmisk skala, og kurven er en sigmoidkurve. Den kan dog forekomme lineær, når der anvendes et snævert standardinterval. Udtag de korrekte prøvemængder til fortyndingsfaktoren, og angiv som mg VTG/ml plasma.

Bestemmelse af minimumsdetektionsgrænser (MDL)

Ofte, særlig hos normale hanner, er det ikke indlysende, hvordan resultater med lave værdier skal rapporteres. I disse tilfælde bør der anvendes 95 % "konfidensintervaller" til at bestemme, om værdien skal angives som nul eller som et andet tal. Hvis prøveresultatet ligger inden for konfidensintervallet for nulstandarden

▼**M8**

(B_o), bør resultatet angives som nul. Minimumsdetektionsgrænsen vil være den laveste standard, der konsekvent er forskellig fra nulstandarden, hvilket vil sige, at de to konfidensintervaller ikke overlapper hinanden. For alle prøveresultater, der ligger inden for konfidensintervallet for minimumsdetektionsniveauet eller derover, angives den beregnede værdi. Hvis prøven ligger mellem nulstandarden og konfidensintervallerne for minimumsdetektionsniveauet, bør halvdelen af minimumsdetektionsniveauet angives for værdien af denne prøve.

LITTERATUR

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

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

▼**M8**

Tillæg 7

STATISTISK ANALYSE

LAGDA genererer tre former for data, der kan analyseres statistisk: (1) kvantitative kontinuerlige data, (2) tid til hændelse-data for udviklingsraterne (tid til NF stadium 62) og (3) ordinaldata i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier fra histopatologiske evalueringer. Det anbefalede statistiske beslutningstræ for LAGDA fremgår af figur 1. Nedenfor findes ligeledes nogle kommentarer, der kan være nødvendige i forbindelse med udførelsen af den statistiske analyse af målingerne fra LAGDA. Til beslutningstræet bør resultaterne af målinger af dødelighed, vækst (vægt og længde) og lever-somatisk indeks (LSI) analyseres i henhold til grenen "Andre endepunkter".

Kontinuerlige data

Data for kontinuerlige endepunkter bør først kontrolleres for monotoni ved rangordenstransformation af data, tilpasning til en ANOVA-model og sammenligning af lineære og kvadratiske kontraster. Hvis dataene er monotone, bør der udføres en step-down Jonckheere-Terpstra trend test på replikatmedianer, og der udføres ikke andre analyser. Alternativt kan der for data, der er normalfordelt med varianshomogenitet, anvendes en step-down Williams-test. Hvis dataene ikke er monotone (kvadratisk kontrast er signifikant, mens den lineære kontrast ikke er signifikant), bør de analyseres ved hjælp af en blandet ANOVA-model. Dataene vurderes dernæst for normalitet (helst ved hjælp af Shapiro-Wilk- eller Anderson-Darling-test) og varianshomogenitet (helst ved hjælp af Levene-test). Begge test udføres på residualer på den blandede ANOVA-model. Ekspertvurderinger kan bruges i stedet for disse formelle test for normalitet og varianshomogenitet, selv om formelle test foretrækkes. Hvis dataene er normalt fordelt med homogen varians, er antagelserne for en blandet ANOVA opfyldt, og en signifikant behandlingseffekt bestemmes ved Dunnett-testen. Konstateres der anormalitet eller variansheterogenitet, bør der søges en normaliserende, variansstabiliserende transformation. Kan der ikke konstateres en sådan transformation, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved hjælp af Dunns test. Når det er muligt, udføres der en ensidet test i modsætning til en tosidet test, men det kræver en ekspertvurdering at afgøre, hvilken test der er hensigtsmæssig for et givent endepunkt.

Dødelighed

Data for dødelighed analyseres for den tidsperiode, der omfatter hele testen, og udtrykkes som den andel, der døde i hver enkelt beholder. Haletudser, der ikke fuldfører metamorfosen inden for den fastsatte tidsramme, haletudser, der indgår i larvedelprøvekohorten, unge frøer, der udvælges, og dyr, der måtte være døde som følge af forsøgsfejl, behandles som bortcensurerede data og bør ikke indgå i nævneren ved procentberegningen. Forud for enhver statistisk analyse bør dødelighedsandelene gennemgå en arcsin-kvadratrodstransformation. Alternativt kan step-down Cochran-Armitage-testen anvendes, eventuelt med en Rao-Scott-justering, når der er overdispersion.

Vægt og længde (vækstdata)

Hanner og hunner er ikke seksuelt dimorfe under metamorfosen, så vækstdataene for larvedelprøven bør analyseres uafhængigt af køn. Vækstdataene for unge frøer bør imidlertid analyseres separat på grundlag af genetisk køn. En logaritmisk transformation kan være nødvendig for disse endepunkter, da logaritmisk normalfordeling af størrelsesdata ikke er usædvanlig.

▼M8

Lever-somatisk indeks (LSI)

Levervægten bør normaliseres som andele af den samlede kropsvægt (dvs. LSI) og analyseres separat på grundlag af genetisk køn.

Tid til NF stadium 62

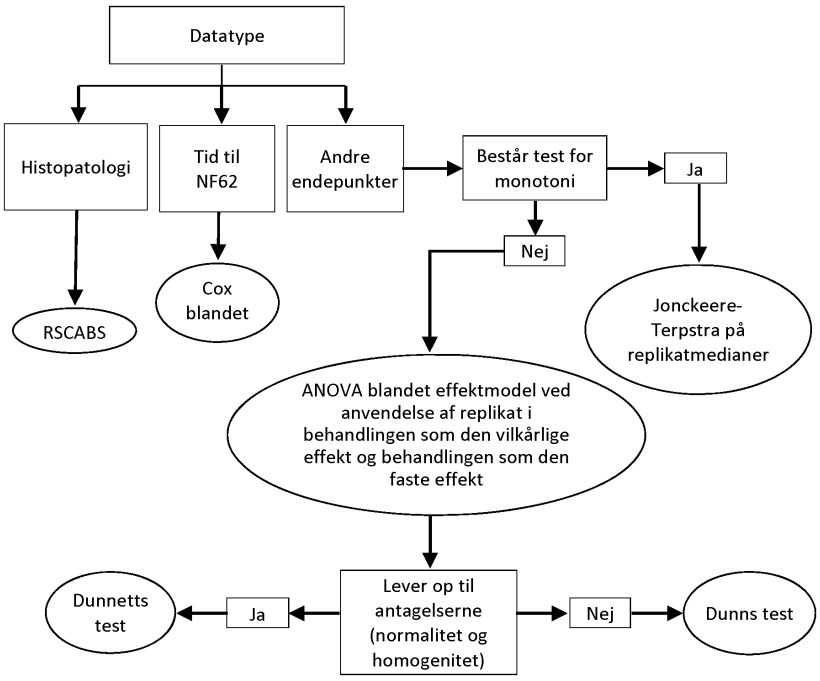
Tid til metamorfosedata bør behandles som tid til hændelse-data, idet eventuelle døde individer eller individer, der ikke når NF stadium 62 inden for 70 dage, behandles som højrecensorerede data (dvs. den reelle værdi er højere end 70 dage, men undersøgelsen afsluttes, inden dyrene har nået NF stadium 62 inden for 70 dage). Mediantiden til NF stadium 62-fuldførelse af metamorfose i fortyndingsvandskontrollerne anvendes til at bestemme datoen for afslutning af testen. Mediantiden til fuldførelse af metamorfosen kan bestemmes ved hjælp af Kaplan-Meier product-limit estimatorer. Dette endepunkt bør analyseres ved hjælp af Cox' blandede effektmodel for fare, der tager hensyn til undersøgelsens replikatstruktur.

Histopatologiske data (alvorsgrad og udviklingsstadier)

Histopatologiske data foreligger i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier. En test kaldet RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) anvender en step-down Rao-Scott justeret Cochran-Armitage trend test på hver alvorsgrad i et histopatologisk respons (Green *et al.*, 2014). Rao-Scott justering indarbejder forsøgsdesignet med replikatbeholdere i testen. Proceduren "by Slices" indarbejder den biologiske forventning om, at effektens alvor har tendens til at stige med stigende doser eller koncentrationer, samtidig med at de individuelle niveauer bevares, og alvoren af eventuelle påviste effekter vises. RSCABS-proceduren bestemmer ikke blot, hvilke behandlinger der statistisk set er forskellige fra kontrollerne (dvs. har en mere alvorlig patologi end kontrolgrupperne), men ligeledes, ved hvilken alvorsgrad forskellen opstår, hvorved der skabes en yderst nødvendig kontekst for analysen. Foretages der inddeling i udviklingsstadier af kønskirtler samt ægge- og sædledere, bør en yderligere manipulering anvendes på dataene, da en af antagelserne i RSCABS er, at effektens alvor stiger med dosis. Den observerede effekt kan være en forsinket eller fremskyndet udvikling. Data om inddeling i udviklingsstadier bør derfor analyseres som anført for at påvise en fremskyndet udvikling og derefter manuelt inverteres, inden der gennemføres en ny analyse for at påvise en forsinket udvikling.

Figur 1

Statistisk beslutningstræ for LAGDA-data



▼M8

LITTERATUR

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼M8

Tillæg 8

OVERVEJELSER OMKRING PÅVISNING OG MINIMERING AF FOREKOMSTEN AF SCOLIOSE

Idiopatisk scoliose, der normalt viser sig som en "bøjet hale" hos haletudser af arten *Xenopus laevis*, kan komplicere de morfologiske og adfærdsmæssige observationer i testpopulationerne. Det bør tilstræbes at minimere eller eliminere forekomsten af scoliose både i bestanden generelt og under testforholdene. I den afsluttende test anbefales det, at prævalensen af moderat og alvorlig scoliose er under 10 % for at forbedre tilliden til, at testen kan påvise behandingsrelaterede udviklingseffekter hos en ellers rask amfibielarve.

Daglige observationer under den afsluttende test bør registrere både forekomsten (antal individer) og alvoren af scoliose, når en sådan forekommer. Arten af abnormiteten beskrives både med hensyn til placering (*f.eks.* foran eller bag kloakåbningen) og kurvens retning (*f.eks.* lateral eller dorsal-til-ventral). Alvoren kan inddeles som følger:

(NR) Ikke markant: ingen bøjning

(1) Minimal: let, lateral bøjning bag kloakåbningen; kun synlig, når individet er i hvile

(2) Moderat: lateral bøjning bag kloakåbningen; synlig hele tiden, men forhindrer ikke bevægelse

(3) Alvorlig: lateral bøjning foran kloakåbningen; ELLER enhver bøjning, der forhindrer bevægelse; ELLER enhver dorsal-til-ventral bøjning.

Et amerikansk EPA FIFRA videnskabeligt rådgivende panel (FIFRA SAP 2013) gennemgik oversigtsdataene for scoliose i 15 Amphibian Metamorphosis Assays med *X. laevis* (NF stadium 51 til 60+) og fremkom med generelle henstillinger til nedbringelse af prævalensen af denne abnormitet i testpopulationerne. Henstillingerne er relevante for LAGDA, selv om denne test omfatter en længere udviklingstidslinje.

Historiske gyderesultater

Generelt bør der anvendes sunde voksne af høj kvalitet som ynglepar; eliminering af ynglepar, der avler afkom med scoliose, kan minimere forekomsten over tid. Helt specifikt kan det være hensigtsmæssigt at minimere brugen af avlsmateriale, der er fanget i naturen. LAGDA-eksponeringsperioden starter med NF stadium 8-til-10 embryoner, og det er ikke muligt fra testens start at bestemme, om bestemte individer vil udvise scoliose. Ud over påvisning af forekomsten af scoliose hos de dyr, der anvendes i testen, bør historiske data om et kulds resultater (herunder prævalensen af scoliose i enhver larve, der har fået lov at udvikle sig) således dokumenteres. Det kan være hensigtsmæssigt at overvåge den del af hvert kuld, der ikke anvendes i en bestemt undersøgelse, og at rapportere disse observationer (FIFRA SAP 2013).

Vandkvalitet

Det er vigtigt at sikre en passende vandkvalitet både i laboratoriebestanden og under testen. Ud over kriterierne for vandkvalitet, der rutinemæssigt evalueres i akvatiske toksicitetstest, kan det være hensigtsmæssigt at overvåge for og korrigere eventuelle næringsstofmangler (*f.eks.* mangel på C-vitamin, calcium, phosphor) eller for høje niveauer af selen og kobber, der rapporteres at forårsage scoliose i varierende grad hos laboratorieopdrættede *Rana* sp. og *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; som rapporteret i FIFRA SAP 2013). Anvendelsen af en passende fodringsplan (jf. tillæg 4) og regelmæssig rengøring af beholderen vil generelt forbedre vandkvaliteten og forsøgsdyrenes sundhed.

▼**M8**

Foder

Specifikke henstillinger til en fodringsplan, der har vist sig at være vellykket i LAGDA, findes i tillæg 4. Det anbefales, at foderkilderne screenes for biologiske toksiner, herbicider og andre pesticider, der er kendt for at forårsage scoliose hos *X. laevis* eller andre vandlevende dyr (Schlenk og Jenkins 2013). For eksempel er eksponering for visse kolinesterasehæmmere blevet knyttet til scoliose hos fisk (Schultz *et al.* 1985) og frøer (Bacchetta *et al.* 2008).

LITTERATUR

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, og 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, og R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, og 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, og D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, og P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., og Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP, referat nr. 2013-03. 21.-23. maj 2013. Washington, DC.